



Exosomes neuronaux : rôle dans le passage intercellulaire de protéines et d'ARN

Mathilde Chivet

► To cite this version:

Mathilde Chivet. Exosomes neuronaux : rôle dans le passage intercellulaire de protéines et d'ARN. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENV011 . tel-00905660

HAL Id: tel-00905660

<https://theses.hal.science/tel-00905660>

Submitted on 18 Nov 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **neurosciences, neurobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Mathilde CHIVET

Thèse dirigée par **Rémy SADOUL**

préparée au sein du **Grenoble - Institut des Neurosciences,**
équipe neurodégénérescence et plasticité

dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Exosomes neuronaux : rôle dans le passage intercellulaire de protéines et d'ARN

Thèse soutenue publiquement le **20 Février 2013**,
devant le jury composé de :

Mme Clotilde THERY

DR2 Inserm, Institut Curie, Paris (Rapporteur)

M. François RASSENDREN

DR2 CNRS, Institut de Génétique Fonctionnelle, Montpellier (Rapporteur)

Mme Marie-Claude POTIER

DR2 CNRS, Institut du Cerveau et de la Moelle, Paris (Examineur)

M. Jean-Paul ISSARTEL

DR2 CNRS, Grenoble-Institut des Neurosciences (Examineur)

M. Alain BUISSON

PR1 UJF, Grenoble-Institut des Neurosciences (Président)

M. Rémy SADOUL

PR1 UJF, Grenoble-Institut des Neurosciences (Examineur)

*Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France /
Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP*



Remerciements

Je tiens à remercier Rémy Sadoul pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir encadrée durant ces trois ans. Les exosomes neuronaux sont un sujet fascinant et j'ai énormément appris au cours de ce doctorat. Merci pour tous les bons moments passés dans ton chalet et la découverte du *jaja*...

Je voudrais remercier tous les membres du jury d'avoir accepté d'en faire partie et plus particulièrement mes deux rapporteurs, Clotilde Théry et François Rassendren. Merci d'avoir accepté de lire et de juger mon travail de thèse.

Je souhaite remercier tous les membres de l'équipe Neurodégénérescence et Plasticité pour leur accueil et leur soutien tout au long de ces trois ans. Commençons par LE peigne central : Béa et Christine, merci pour votre savoir-faire, votre patience et votre sens de l'humour. Béa, la McGyver du labo, ma thèse aurait un tout autre visage sans toi, je te remercie donc pour tes compétences scientifico-bricolo-psycho-humouristiques. Wonder-Christine, si précieuse au moment de la rédaction, merci pour tout : tes compétences en culture cell, tes remarques avisées, tes commandes Beckman et Gibco toujours à pic... Merci les filles !

Anne, ma chère Anne, mille fois merci pour tes mots réconfortants comme des dragibus ☺ je te remercie sincèrement pour tous les échanges que nous avons pu avoir, surtout en culture cellulaire ! Dear Fiona, thank you so much for everything you did for me, I am going to miss your cuddles and your skills in electronic microscopy ;-) et merci à toutes les deux pour vos lectures !

Yves, je te remercie pour ton savoir encyclopédique et ta profonde gentillesse. Ton côté « tête en l'air » m'a parfois fait lever les yeux au ciel (!) mais sache que j'étais très heureuse de gérer les cultures primaires de neurones à tes côtés. Bonne continuation et longue vie aux épines ! Sandrine, merci d'avoir grossi les rangs de l'*exosome team* en travaillant avec tant de rigueur et de persévérance sur *C. elegans*. Tu as toujours eu le mot juste et je te remercie pour tes conseils éclairés.

J'ai une pensée pour Sakina et Chantal qui ont quitté l'équipe. Sakina, merci pour ta douceur et les souris Cre... Chantal, merci pour ta gentillesse sans limite et pour la découverte de la « grolle », un fou-rire mémorable ! Bonne continuation dans vos recherches et dans la vie en général. Je souhaite également plein de bonnes choses aux deux post-docs venus grossir les rangs de l'équipe : José et Karine, merci à tous les deux pour les bons moments passés ensemble et pour votre regard neuf sur les travaux de l'équipe.

Merci à David et Fred pour leur aide technique si précieuse. David, tes chants sous la hotte de culture me manquent ; Fred, merci pour ton aide indispensable avec les souris et les PCR, j'ai envie de dire : « heureusement que tu étais là ! ».

Viennent ensuite les étudiants : d'abord, les anciens, Agnès, Gaëlle et Gilles. Quand je suis arrivée dans le labo, j'étais votre petite dernière, je le quitte maintenant en doyenne ! Agnès, ma *maman Neurones*, merci pour tout ce que tu m'as enseigné. J'ai gardé de très bons souvenirs de nos discussions scientifiques et non scientifiques... Gaëlle, ma *maman Exosomes*, merci pour le passage de flambeau et ton soutien inespéré en fin de thèse. Merci à toutes les deux d'avoir été là pour moi ! Gilles, le surfeur devenu biologiste (whaou !), merci pour ton esprit si vif et ton enthousiasme sans limite... Vive les Cowboys fringants !

Et les petits jeunes : Charlotte, Marine, Romain et Vincent, vous allez me manquer ! Merci pour l'ambiance extraordinaire qui règne dans notre bureau (un doux mélange de sérieux, de fous-rire et de confidences). Romain, tu es un puits de science doublé d'une personnalité attachante, c'était un plaisir de travailler à tes côtés (dans notre peigne). Marine, tant de sagesse et de folie dans un même être, c'est tout simplement génial ! Ne change rien et mets nous KO cette Alix ;-) Vincent, merci de m'avoir fait découvrir les truffes (miam !), j'espère que tes travaux sur Alix et calcium porteront leurs

fruits, bon courage ! Charlotte, mon *booster* à moi, merci pour ta clairvoyance, ton sérieux et ton enthousiasme. Je n'ose imaginer à quoi aurait ressemblé ma 3^{ème} année de thèse sans toi. Sache que je me souviendrai toujours de ton arrivée dans le bureau un matin de janvier... Je ne savais alors pas de quoi nous serions capables toutes les deux. Merci pour tout et longue vie à l'*exosome team* ! J'ai aussi une pensée pour mes petites stagiaires Sabine et Laurianne, c'était un plaisir de vous encadrer.

Je tiens à remercier Amélie, ma gestionnaire et colocataire préférée, et ses collègues. Les filles, vous faites tourner le GIN ! J'ai également une pensée pour Georges, merci pour tout. Ma thèse a réellement bénéficié du contexte scientifique et technique pourvu par l'institut. Je souhaite donc remercier les animaliers, les plateformes de microscopie optique et électronique. J'adresse mes plus profonds remerciements à Karin Pernet-Gallay et Julie Delaroche pour leur aide inestimable dans la traque des exosomes neuronaux. Je voudrais également remercier Antoine Depaulis et Tanguy Chabrol pour les travaux effectués *in vivo* chez le rat. Enfin, j'adresse toute ma reconnaissance à Hélène Ipas et Audrey Guttin pour leurs compétences en transcriptomique. Merci à toutes les deux pour votre gentillesse et votre disponibilité. Hélène, merci pour le chocolat et autre douceur prodiguée de ta voix chantante. Je profite de ces remerciements pour saluer Nora : chère Nora, merci pour tes sourires et ton soutien sans faille tout au long de cette thèse. Merci à toi.

Je remercie très chaleureusement Catherine Rey et Joël Lachuer avec qui j'ai commencé l'aventure ARN. Merci à tous les deux pour vos compétences et votre accueil. Catherine, ton poulet aux morilles reste un excellentissime souvenir ! Bon vent à la plateforme ProfilXpert !

Je voudrais remercier mes copines de l'institut : Anouk, Céline, Alexia, Margot, Audrey, Tiffany et Agata. Merci pour les soirées dindes, les fous-rires, les comités de soutien inespérés. Cette thèse aurait eu un tout autre visage sans vous. Merci à toutes ! Anouk, ma co-bureau, mon amie, merci pour tout ce que tu m'as apporté au GIN et en dehors... On se retrouve très bientôt sur un déco ? ;-)

Je remercie tous mes proches et amis qui, de près ou de loin, m'ont accompagnée tout au long de ces trois ans. Je ne peux pas citer tout le monde mais je pense notamment à Charlotte B, Marie H, Estelle M, Thomas D, Vincent G, Mary B, Julie S, Lénora J, Aline B, Lucie L, Vincent F, Thomas M, Rémi DG, Martin K, Lylou et Yann... et les familles Feutry et Chivet aggrandies. Merci à tous pour vos encouragements ! J'ai également une pensée pour Aymeric et sa famille, merci pour tous les bons moments passés à Lyon.

Enfin, je tiens à remercier ma famille. Merci à mes parents chéris pour leur amour et leur soutien indéfectibles. Merci à mes frères et sœurs pour leur bonne humeur et leur foi en moi inébranlable. J'ai la chance d'avoir un cocon familial exceptionnel et je vous remercie tout simplement d'être là, comme vous êtes, je vous aime. Sachez que je garderai toujours en mémoire la séance de relecture collective dans le chalet familial. Merci, merci, merci.

En dernier lieu, je voudrais dire un grand MERCI à mon pilote-pâtissier-guitariste préféré. Merci pour ton amour, ta présence *smooth* et toutes tes petites attentions. J'ai bénéficié grâce à toi d'un environnement exceptionnel pour rédiger mon manuscrit. Dans quelques mois, je tâcherai d'être à la hauteur pour te soutenir, te chérir et t'encourager lors de ta rédaction. Et bien sûr, gloire à Smoothie ;-)

Liste des principales abréviations

4-AP : 4-Aminopyridine
Alg2 : Apoptosis Link Gene 2
Alix : Alg2 Interacting Protein X
AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ARN : Acide ribonucléique
CHMP : Charged multivesicular body protein
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DIV : Days *in vitro*
EEA1 : Early Endosomal Antigene 1
EGF : Epidermal Growth Factor
ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport
GABA : γ -Aminobutyric acid
GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP : Green Fluorescent Protein
GPI : Glycosylphosphatidylinositol
HRP : Horseradish peroxylase (peroxydase du raifort)
Hrs : Hepatocyte growth factor receptor substrate
ILV : Intraluminal Vesicles
Lamp1 : Lysosomal associated membrane protein 1
LBPA : Lyso-*bis*-phosphatidic acid (autre nom : BMP)
ME : Microscopie Electronique, MET : Microscopie Electronique à Transmission
MVB : Multivesicular Body, corps multivésiculé
MVE : Multivesicular Endosome, endosome multivésiculé
NMDA : N-Methyl-D-aspartic acid
PI(3)P : Phosphatidyl-Inositol 3 Phosphate
PLP : Protéine protéolipide
Pmel : Pigment cell-specific type I integral membrane protein
SNARE : SNAP (*Soluble NSF Attachment Protein*) Receptors
SNC : Système Nerveux Central
TEM : Tetraspanin-Enriched Microdomain
TeNT : Tetanus Neurotoxin, toxine du tétanos
TfR : Transferrin Receptor, récepteur à la transferrine
Tsg101 : Tumor susceptibility gene 101
TTC : Fragment C-terminal de la chaîne lourde de la toxine du tétanos
VAMP : Vesicular Associated Membrane Protein
Vps : Vacuolar protein sorting

Table des matières

Introduction.....	8
I. Les exosomes, des vésicules extracellulaires issues de la voie endocytaire	8
1. Des vésicules extracellulaires	8
2. L'endocytose	11
3. Les compartiments de la voie endocytaire	13
4. La découverte des exosomes	16
II. Formation et fonction des exosomes.....	18
1. Biogénèse des exosomes	18
2. Mécanismes de libération	28
3. Composition des exosomes	38
4. Fonctions des exosomes	47
5. Recapture des exosomes	52
III. La voie endocytaire dans les neurones.....	59
1. Endocytose des récepteurs au glutamate et plasticité synaptique	61
2. Les exosomes dans le système nerveux	67
3. Propagation de la toxine du tétanos dans le système nerveux	74
Objectifs de la thèse.....	81
Matériel et méthodes.....	82
I. Culture cellulaire.....	82
1. Culture lignée	82
2. Obtention d'une lignée exprimant constitutivement GFP-CD63	82
3. Culture primaire	82
4. Transfection.....	83
Transfection des lignées cellulaires au JetPEI	83
Transfection des neurones d'hippocampe à la lipofectamine	84
5. Coloration au WGA	84
II. Purification des exosomes	84
1. Centrifugations différentielles.....	84
2. Fractionnement des exosomes sur gradient de sucrose	85
III. Lysats cellulaires	86
IV. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS PAGE)	86
V. Western blot.....	86
VI. Immunofluorescence	87
1. Immunofluorescence des compartiments synaptiques.....	87
2. Immunofluorescence des compartiments de la voie endocytaire	87
VII. Anticorps	87
VIII. Stimulation des cultures primaires.....	89

1. Milieux basal et dépolarisant	89
2. Agents chimiques utilisés sur les neurones	90
3. Protocoles de stimulation	90
IX. Extraction d'ARN	90
1. Extraction d'ARN totaux	90
2. Extraction d'ARN courts	91
3. Analyse des ARN	91
X. RT-q-PCR	92
1. Transcription inverse	92
2. q-PCR	92
XI. GFP-TTC et TTC-HRP	93
1. Production	93
GFP-TTC	93
TTC-HRP	93
2. Incubation sur les neurones	93
XII. Incubation d'exosomes sur neurones d'hippocampe	94
1. Exosomes de N2a	94
2. Exosomes neuronaux	94
3. Observation en microscopie à fluorescence	95
XIII. Microscopie électronique	95
1. Préparation du culot d'exosomes	95
2. Immunogold sur culot d'exosomes	95
Article 1	97
I. Résultats	97
1. La sécrétion d'exosomes par des neurones matures est régulée par le calcium intracellulaire	97
2. L'observation en microscopie électronique de neurones en culture révèle la présence d'exosomes sécrétés, à proximité de la membrane plasmique	98
3. La GFP-TTC est sécrétée par voie exosomale	98
4. La sécrétion d'exosomes est régulée par l'activité glutamatergique	99
II. Conclusion de l'article 1	100
Article 1, données supplémentaires	101
I. Caractérisation de la sortie des exosomes de neurones corticaux en culture	101
II. Trafic de la GFP-TTC dans des neurones en culture	106
Résultats	113
I. Suivi d'exosomes fluorescents	113
1. Caractérisation des exosomes de N2a	114
2. Choix d'un marqueur fluorescent	116
3. Incubation sur des neurones en culture	122
4. Suivi de l'internalisation des exosomes GFP-CD63 par des neurones en culture	125

II. La toxine du tétanos	132
1. Les exosomes GFP-TTC se fixent et sont internalisés par les neurones.....	132
2. Les exosomes portant la GFP-TTC présentent une spécificité de fixation intercellulaire.....	138
3. Les exosomes portant la GFP-TTC présentent une spécificité de fixation subcellulaire	141
III. ARN exosomaux.....	143
1. Analyse du contenu en ARN des exosomes de N2a	143
2. Analyse du contenu en ARN des exosomes neuronaux.....	145
3. La surexpression de miR dans les N2a conduit à leur enrichissement dans les exosomes.....	150
Discussion.....	152
I. Les neurones sécrètent des exosomes de façon régulée.....	152
1. Régulation par le calcium	152
2. Régulation par l'activité synaptique.....	156
II. Recapture des exosomes par les neurones.....	160
1. Exosomes de N2a GFP-CD63.....	160
2. Exosomes GFP-TTC neuronaux.....	165
III. Les exosomes neuronaux transportent des ARN	169
1. Les exosomes, une voie de sécrétion pour les ARN	169
2. Les exosomes neuronaux contiennent des ARN parmi lesquels, des microARN	170
3. Quels mécanismes régissent l'adressage des ARN dans les exosomes ?.....	172
4. Fonction des ARN exosomaux dans le système nerveux ?	173
Références bibliographiques.....	176
Appendix.....	193
Article 1	193
Article 2	193

Introduction

I. Les exosomes, des vésicules extracellulaires issues de la voie endocytaire

1. Des vésicules extracellulaires

La communication cellulaire est la base du bon fonctionnement d'un organisme pluricellulaire. Les cellules peuvent communiquer par contact cellule-cellule ou par libération de médiateurs chimiques. Ces derniers, une fois dans le milieu extracellulaire, vont se fixer à leurs récepteurs et engendrer une cascade de signalisation régulant ainsi la physiologie de la cellule receveuse. Mais les cellules sont également capables de sécréter des vésicules membranaires contenant des lipides, des protéines et des acides nucléiques. Ces vésicules libérées dans le milieu extracellulaire peuvent modifier la physiologie des cellules réceptrices.

Il existe différents types de vésicules sécrétées dont l'origine intracellulaire diffère ([Figure 1](#)). On distingue généralement les vésicules issues du bourgeonnement de la membrane plasmique et les vésicules d'origine intracellulaire. Ainsi, les microvésicules, les ectosomes et les particules membranaires sont directement formés à partir de la membrane plasmique alors que les exosomes, eux, ont une origine endosomale. Ces derniers se forment en effet dans les compartiments endosomaux et sont relargués dans le milieu extracellulaire lors de la fusion de ces compartiments avec la membrane plasmique. Enfin, la mort cellulaire peut s'accompagner de la libération de vésicules apoptotiques. En effet, le désassemblage du cytosquelette provoque dans la cellule en apoptose des déformations membranaires. Ces renflements de la membrane plasmique (*membrane blebs*) peuvent se détacher et former des vésicules ou corps apoptotiques. Toutes ces vésicules extracellulaires se différencient non seulement par leur origine mais aussi par les caractéristiques morphologiques, physiques et biochimiques qui en découlent ([Tableau 1](#), adapté de [\(Thery et al., 2009\)](#)).

Les exosomes se distinguent par leur taille (de 50 à 100 nm) et par une forme homogène en microscopie électronique qui s'apparente à celle des hématies : ronde et aplatie au centre ([Figure 2](#)). Déposés sur un gradient de sucrose, ils flottent à une densité comprise entre 1.12 et 1.19 g/ml. Enfin, de part leur origine endosomale, ils contiennent des protéines et des lipides caractéristiques distincts de la membrane plasmique.

Tableau 1 Caractéristiques physico-chimiques des vésicules extracellulaires. ND = Non Déterminé (adapté de (Théry et al., 2009)).

	taille	densité dans le sucrose	apparence en EM	sédimentation	composition lipidique	marqueurs protéiques	origine	bibliographie	type cellulaire ou fluide employé dans l'étude
exosomes	50-100 nm	1,13-1,19 g/mL	forme d'hématie	100 000 g	enrichis en cholestérol, sphingomyéline et céramide ; radeaux lipidiques ; phosphatidylsérine	tétraspanines (CD63, CD9), Alix, Tsg101	endosomes (compartiments intracellulaires)	Pan <i>et al.</i> , 1985 ; Raposo <i>et al.</i> , 1996 ; Théry <i>et al.</i> , 2006	réticulocytes, lignée Lymphocytes B RM, JV, EBV-transformées, cellules & fluides cellulaires variés
microvésicules	100-1000 nm	ND	forme irrégulière, plus ou moins dense aux électrons	10 000 g	exposent de la phosphatidylsérine	intégrines, sélectines, ligand CD40	membrane plasmique	Bess <i>et al.</i> , 1997 ; Heijnen <i>et al.</i> , 1999 ; Ratajczak <i>et al.</i> , 2006	lignées Lymphocytes T ; plaquettes
ectosomes	50-200 nm	ND	structures rondes, bilamellaires	160 000-200 000 g	enrichis en cholestérol, diacylglycérol ; phosphatidylsérine	CRL, protéases, absence de CD63	membrane plasmique	Gasser <i>et al.</i> , 2003 ; Eken <i>et al.</i> , 2010	neutrophiles polymorphonucléés, cellules endothéliales HUVEC, érythrocytes
particules membranaires	50-80 nm	1,04-1,07 g/mL	forme ronde	100 000-200 000 g	ND	CD133, absence de CD63	membrane plasmique	Marzocco <i>et al.</i> , 2005	fluide ventriculaire cerveau embryonnaire de souris, cellules Caco-2
vésicules "exosome-like"	20-50 nm	1,1 g/mL	forme irrégulière	175 000 g	absence de radeaux lipidiques	TNFR1	compartiments cellulaires ?	Hawari <i>et al.</i> , 2004	fluide de lavage bronchoalvéolaire, serum, cellules endothéliales vasculaires de cordon ombilical humain (HUVEC)
vésicules apoptotiques	50-500 nm	1,16-1,28 g/mL	hétérogène	1200, 10 000 ou 100 000 g	ND	histones	ND	Théry <i>et al.</i> , 2001 ; Schable <i>et al.</i> , 2003	lignée D1 de cellules dendritiques murines dérivées de la rate ; monocytes & macrophages
ARMMS (arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles)	~45 nm, <100 nm	ND	forme ronde	120 000 g	ND	ARRDC1, Tsg101, absence de CD63	membrane plasmique	Nabhan <i>et al.</i> , 2012	HEK293T
"exosomes membranaires"	~100 nm	1,15-1,23 g/mL	hématie	70 000 g	N-Rh-PE-labeled (phospholipide)	CD63, CD81	domaines endosome-like de la membrane plasmique	Booth <i>et al.</i> , 2006	lymphocytes T Jurkat, cellules K562 & lymphocytes T humains

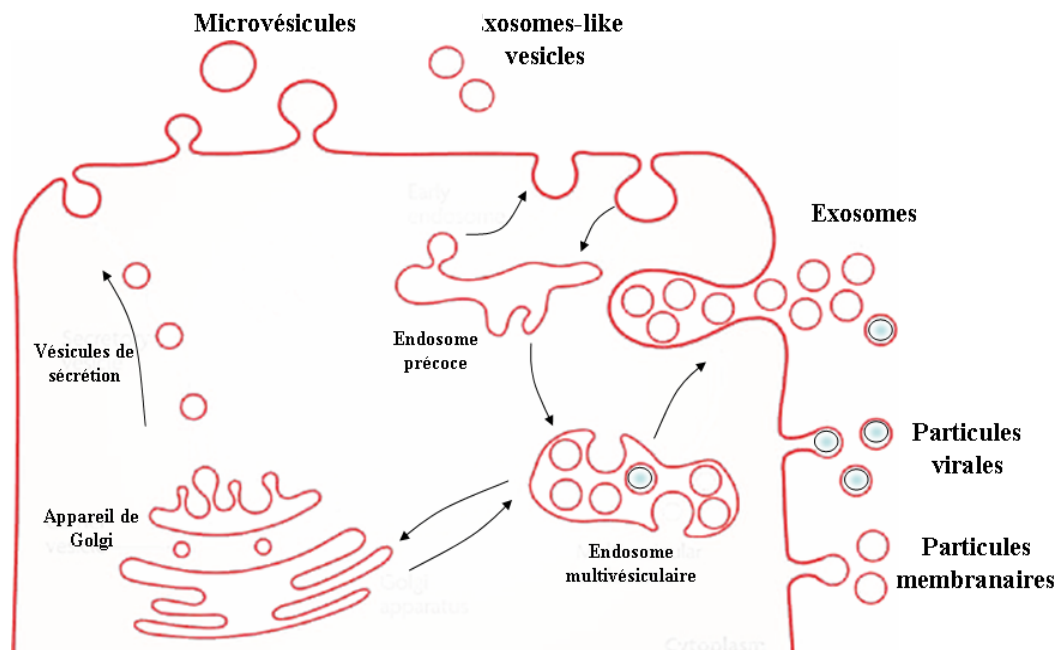


Figure 1 Les cellules sécrètent différents types de vésicules. La sécrétion de protéines solubles se produit à partir de la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique. Ces vésicules de sécrétion sont formées à partir de l'appareil de Golgi et contiennent du matériel contenu dans le lumen du compartiment. A l'opposé, les vésicules membranaires sécrétées par les cellules contiennent du matériel d'origine cytosolique. On distingue les vésicules qui émanent directement de la membrane plasmique (microvésicules et particules membranaires), et celles qui ont pour origine l'invagination d'une membrane intracellulaire (exosomes). Les particules virales auraient la capacité d'émerger à la fois de la membrane plasmique et des membranes internes en utilisant la voie exosomale (adapté de (Thery et al., 2009)).

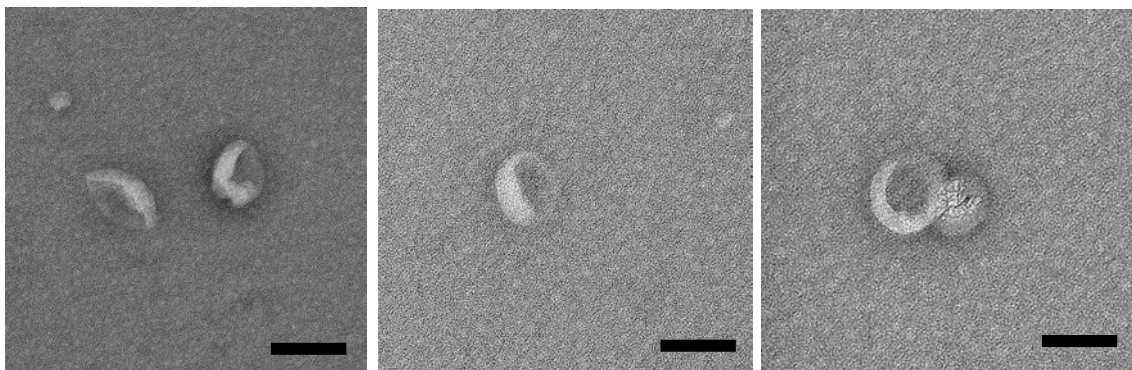


Figure 2 Exosomes neuronaux observés en microscopie électronique à transmission. Des neurones ont été incubés pendant 3h dans un milieu dépolarisant, et les exosomes sécrétés pendant ces trois heures ont été récupérés par ultracentrifugation, puis fixés et préparés pour la microscopie électronique à transmission, MET (G. Lachenal). Bar : 100 nm.

2. L'endocytose

La membrane plasmique est le siège de différents mécanismes d'endocytose qui en contrôlent la composition en lipides et en protéines, régulant ainsi les interactions de la cellule avec son environnement extérieur. Par exemple, l'expression de récepteurs transmembranaires à la surface des cellules (là où ils sont capables d'interagir avec leurs ligands extracellulaires) est la résultante d'un équilibre entre les mécanismes d'apport et de dégradation. L'apport est assuré par la voie de synthèse et de sécrétion, et le retrait par la voie endocytaire. L'endocytose de ces récepteurs régule donc la sensibilité des cellules à leurs ligands spécifiques. L'endocytose joue également un rôle-clé dans des processus biologiques variés tels que la captation de nutriments, la mitose, le remodelage de la membrane plasmique, le maintien de la polarité et la migration cellulaire (Doherty and McMahon, 2009).

Dans les cellules eucaryotes, ont été identifiées plusieurs voies d'internalisation qui varient par le cargo transporté et la machinerie protéique impliquée (Figure 3). La phagocytose est une évagination de la membrane plasmique autour d'une particule étrangère. Elle n'est réalisée que par des cellules spécialisées comme par exemple les macrophages. Tandis que la pinocytose, qui permet l'internalisation de fluides et de solutés, est réalisée par tous les types cellulaires. Le terme pinocytose regroupe plusieurs voies d'endocytose parmi lesquels la macropinocytose, l'endocytose clathrine-dépendante et les voies dites clathrine-indépendantes : cavéoline-dépendante, CLIC-GEEC, flotilline-dépendante, Arf6-dépendante (ADP-ribosylation factor-6;), etc. (Howes et al., 2010). La voie CLIC/GEEC implique une vésiculation de la membrane plasmique indépendante de la clathrine (CLIC : *Clathrin Independent Carriers*) qui fusionne avec un compartiment endosomal enrichi en protéines à ancre GPI (GEEC : *Glycophosphatidylinositol-anchored protein Enriched Endosomal Compartment*).

Même si leur initiation diffère, tous ces mécanismes impliquent une déformation de la membrane plasmique qui conduit à la formation d'une vésicule d'endocytose. Une fois formée, celle-ci fusionne avec des compartiments intracellulaires appelés endosomes précoces. De là, les protéines endocytées sont soit recyclées à la membrane soit sélectionnées pour être dégradées dans les lysosomes.

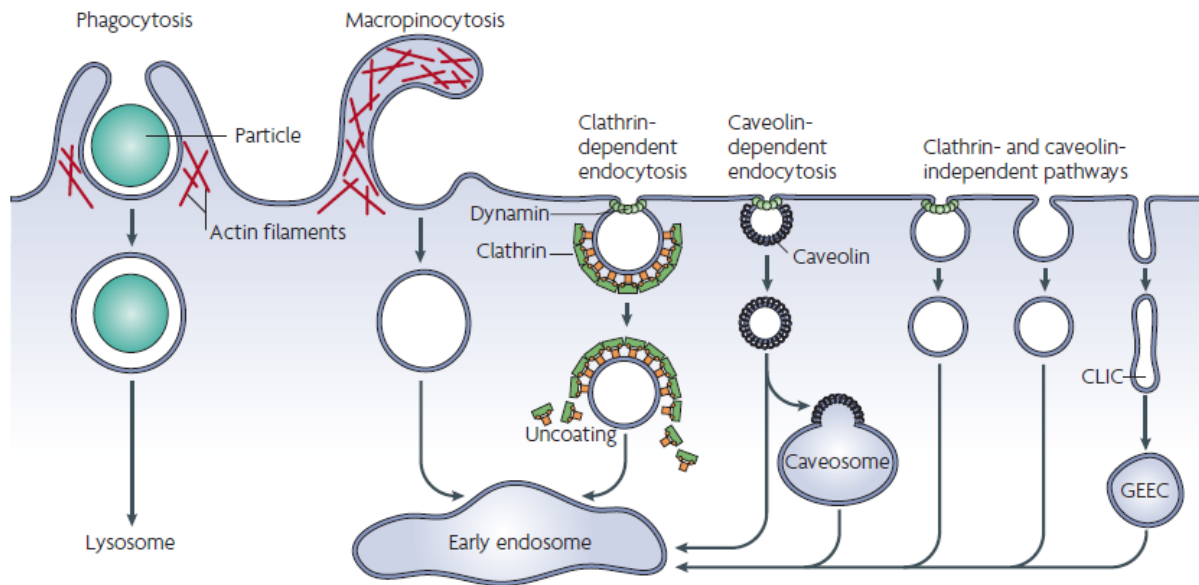


Figure 3 Les voies d'entrée dans la cellule eucaryote. La phagocytose et la macropinocytose permettent respectivement l'entrée de grosses particules et de fluide. Ces deux voies dépendent de l'actine. L'internalisation de matériel membranaire par endocytose peut faire intervenir la clathrine ou la cavéoline. Ces deux voies nécessitent l'intervention de la dynamine, une GTPase qui permet la scission entre la vésicule d'endocytose et la membrane plasmique. Il existe également des mécanismes d'endocytose indépendants de la clathrine et de la cavéoline, pouvant être également indépendants de la dynamine. Quel que soit le mécanisme d'endocytose, les vésicules formées vont fusionner avec les endosomes précoces (Mayor and Pagano, 2007).

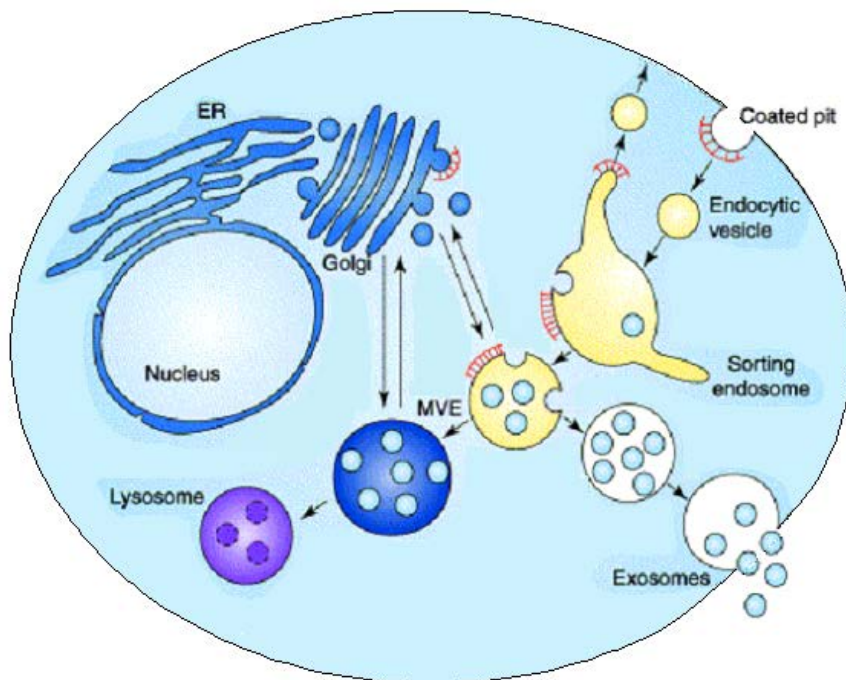


Figure 4 Voie endocyttaire et biogenèse des exosomes. Les glycoprotéines de la surface membranaire sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique puis exportées à travers le système de Golgi jusqu'à la membrane plasmique. A la membrane, elles sont endocytées via les puits recouverts de clathrine. Les vésicules d'endocytose fusionnent avec les endosomes précoces à partir desquels les protéines sont soit recyclées à la membrane soit envoyées vers la dégradation lysosomale. Les protéines destinées à la dégradation sont sélectivement entraînées dans des vésicules qui bourgeonnent à partir de la membrane limitante des endosomes. Ces vésicules intraluminales s'accumulent dans des endosomes intermédiaires appelés endosomes multivésiculés (MVE). Les MVE fusionnent généralement avec les endosomes tardifs et les lysosomes entraînant l'hydrolyse des vésicules et de leur cargo. Ils peuvent aussi fusionner avec la membrane plasmique, relarguant ainsi dans le milieu extracellulaire leurs exosomes (adapté de (Raiborg et al., 2003)).

3. Les compartiments de la voie endocytaire

i. Endosomes de tri

La membrane plasmique est une structure hautement dynamique. Les protéines et les lipides qui la composent sont renouvelés en permanence. Ils sont internalisés dans des vésicules d'endocytose, et envoyés vers les endosomes précoces. Ces derniers sont également appelés endosomes de tri puisque c'est dans ces compartiments que s'effectue le tri des protéines « à dégrader » et des protéines « à recycler » (Figure 4). Les endosomes précoces sont caractérisés par une forme tubulo-vésiculaire décrite pour la première fois à la fin des années 1980 (Geuze et al., 1987; Gruenberg et al., 1989). Les petites GTPases Rab4 et Rab5 et la protéine EEA1 (*Early Endosome Antigen 1*) sont considérés comme des marqueurs de ces endosomes précoces.

A ce niveau, la voie par défaut est la voie du recyclage vers la membrane plasmique. Les éléments destinés à être recyclés se concentrent dans les parties tubulaires de l'endosome précoce qui se détachent pour donner les endosomes de recyclage (marqués par les protéines Rab4 et Rab11). En revanche, les protéines qui portent un signal positif de dégradation vont s'accumuler dans la partie vacuolaire de l'endosome précoce. Elles sont regroupées dans des zones de membrane d'où bourgeonnent des vésicules intraluminales qui se détachent dans le lumen de l'endosome (Stoorvogel et al., 1991). Les vésicules intraluminales s'accumulent dans la lumière de ce que l'on appelle alors corps multivésiculé (MVB, *multivesicular body*) ou endosome multivésiculé (MVE, *multivesicular endosome*).

ii. Endosomes multivésiculés et dégradation

Les premières observations de compartiments multivésiculés en provenance des endosomes précoces datent de la fin des années 80 (Gruenberg et al., 1989). Les chercheurs observent alors l'existence d'intermédiaires multivésiculés entre les endosomes précoces et les compartiments plus tardifs. Les endosomes multivésiculés (MVE) mesurent environ 500 nm de diamètre et sont remplis de vésicules intraluminales (ILV) d'une taille comprise entre 50 et 100 nm (Figure 5).

Les ILV concentrent des molécules et des récepteurs de surface destinés à la dégradation comme le récepteur à l'EGF (*epidermal growth factor*) qui se retrouve environ 30 minutes après son endocytose dans les MVE (Falguieres et al., 2008). Les MVE migrent le long des microtubules grâce à leur association avec la dynéine, un moteur moléculaire qui les ancre sur les microtubules. Le cytosquelette d'actine jouerait également un rôle dans cette mobilité. La fusion des MVE avec les lysosomes aboutit à la destruction des vésicules intraluminales et de leur contenu (Gruenberg and Stenmark, 2004).

Les lysosomes sont des compartiments acides dont le pH est maintenu entre 3,5 et 5 par la présence au niveau de leur membrane de pompes à protons et de canaux ioniques. Ce pH très acide est indispensable au fonctionnement des hydrolases acides qu'ils contiennent.

Parmi les protéines présentes dans les lysosomes, Lamp1 et Lamp2 (*lysosomal associated membrane protein 1/2*) sont très souvent utilisées comme des marqueurs de la membrane lysosomale. La protéine Lamp1 est également associée aux MVE qui contiennent aussi la GTPase Rab7 et des tétraspanines (protéines à 4 domaines transmembranaires) comme CD63 (également appelée Lamp3).

En marge de cette voie classique de dégradation, il a été montré que les endosomes multivésiculés peuvent également fusionner avec la membrane plasmique, permettant la libération des vésicules intraluminales, qui, une fois dans le milieu extracellulaire, sont appelées exosomes.

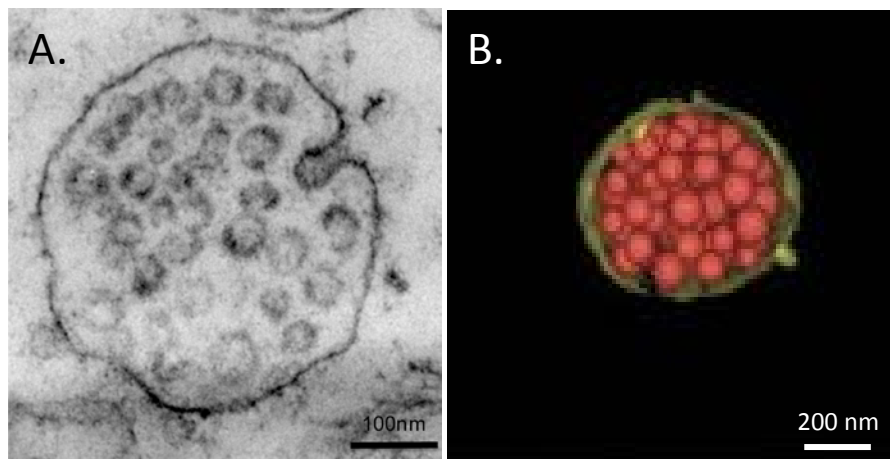


Figure 5 Observation d'endosomes multivésiculés. A. Bourgeonnement d'une vésicule dans le lumen d'un endosome multivésiculé repéré dans la partie CA1 de l'hippocampe (MET sur tranche, F. Hemming (Chivet et al., 2012)). B. Reconstruction 3D d'un MVE par tomographie électronique chez *S. cerevisiae* (Nickerson et al., 2006).

iii. Différents types de MVE ?

Il a été montré d'une part que les MVE fusionnaient avec les lysosomes et d'autre part, qu'ils étaient capables de fusionner avec la membrane plasmique. S'agit-il d'un même type de MVE « multifonction » ou alors certains sont uniquement destinés à la dégradation et d'autres affectés à la libération d'exosomes ? Existerait-il différents types d'endosomes multivésiculés ?

Un début de réponse peut être apporté, basé sur l'étude des lipides qu'ils contiennent. Les MVE concentrent certains lipides par rapport aux autres membranes de la cellule, comme le PI(3)P (Phosphatidyl Inositol 3-phosphate) et des sphingolipides (gangliosides (GM1) et céramides) et du cholestérol. La présence de ces lipides rendrait la membrane des ILV sensible aux hydrolases acides lysosomales et faciliterait ainsi leur dégradation (Piper and Katzmann, 2007). Certains MVE seraient enrichis en LBPA (lyso-*bis*-phosphatidic acid) et d'autres non (White et al., 2006). De plus, les ILV contenant du LBPA seraient distinctes de celles présentant du PI(3)P (Kobayashi et al., 2002). Enfin, seule une majorité des MVE seraient riches en cholestérol dans lesquels ce lipide s'accumule dans les ILV (Mobius et al., 2002; Mobius et al., 2003). Ces différences de composition lipidique semblent suggérer l'existence de plusieurs sous-populations de MVE.

Cette hypothèse a été avancée dans l'étude réalisée par White et al en 2006, qui montre qu'après stimulation de l'EGF-R par son ligand, le récepteur est envoyé dans la voie de dégradation par des compartiments multivésiculés qui ne contiennent pas de LBPA. La stimulation à l'EGF augmenterait à la fois la formation de ces nouveaux MVE et le bourgeonnement d'ILV contenant l'EGF-R (White et al., 2006). Les MVE pourraient donc se distinguer par leur composition lipidique mais également par leur cargo. C'est notamment ce que décrivent Theos et al en 2006 dans les mélanocytes. Dans cette étude, les MVE dont les ILV contiennent la Pmel (*pigment cell-specific type I integral membrane protein*) seraient différents de ceux enrichis en LBPA qui sont des organelles distincts dans les mélanocytes (Theos et al., 2006). En 2009, Buschow et ses collaborateurs étudient la sécrétion d'exosomes par les cellules dendritiques. Ils démontrent que ces cellules sécrètent des exosomes transportant le CMH II en réponse à des interactions apparentées avec des lymphocytes T. L'adressage des molécules du CMH II dans les futurs exosomes impliquerait des voies de vésiculation de l'endosome distinctes de celles qui conduisent à la dégradation lysosomale. Ces travaux suggèrent donc l'existence de MVE différents (Buschow et al., 2009).

Enfin, la sécrétion par un même type cellulaire d'exosomes hétérogènes comme c'est le cas pour les exosomes de cellules épithéliales pose la question d'une origine intracellulaire différente (van Niel et

al., 2001). En effet, les exosomes apicaux et basaux sécrétés par ces cellules diffèrent par leur composition protéique. L'existence de ces deux types d'exosomes indique un tri actif des protéines au niveau de MVE potentiellement distincts. Quant aux travaux de Baietti *et al*, ils suggèrent l'existence de sous-populations exosomales en notant un comportement différent des exosomes selon les protéines qu'ils contiennent. Ils distinguent les exosomes Flotilline-1 positifs de ceux contenant le trio de protéines suivant : la tétraspanine CD63 et les protéines cytosoliques Alix (Alg2 Interacting Protein X) et synténine (Baietti *et al.*, 2012).

L'hypothèse de l'existence de plusieurs types de MVE semble donc plausible même si elle n'a pas encore été formellement démontrée. Les nombreux travaux sur la biogénèse des vésicules intraluminales ont montré qu'elle impliquait différents mécanismes (cf. paragraphe II.1) et apportent d'autres éléments de réponse pour étayer cette hypothèse.

4. La découverte des exosomes

i. Un peu d'Histoire...

En 1981, Trams *et al* décrivent des microvésicules de 40 nm environ sécrétées *in vitro* par plusieurs types cellulaires (Gliome C-6, neuroblastome N-18). Elles sont enrichies en phospholipides polyinsaturés et en sphingolipides. Leur composition lipidique et protéique diffère significativement de la membrane plasmique, ce qui suggère qu'elles ont une origine différente. Les cellules libèreraient dans ces microvésicules la 5' nucléotidase, une enzyme ancrée dans la membrane par un groupement GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol), qui clive les nucléotides extracellulaires en nucléosides capables de traverser les membranes. Cette équipe est la première à suggérer le terme d'exosomes pour désigner ces microvésicules sécrétées par les cellules dans le milieu extracellulaire et qui ne proviendraient pas directement de la surface cellulaire (Trams *et al.*, 1981).

L'origine endocytaire de ces microvésicules est avancée dans les années 80 par deux équipes dirigées respectivement par Philip Stahl et par Rose M. Johnstone. Elles publient les premières figures d'exocytose de vésicules d'une cinquantaine de nanomètres observées en microscopie électronique dans des cultures de réticulocytes de rat (Harding *et al.*, 1983) et de mouton (Pan *et al.*, 1985).

Alice in blunderland. C'est en ces termes que Johnstone décrit l'époque où elle et son groupe ont mis en lumière ces curieuses vésicules lipidiques (*blunder* signifie *par hasard*) (Johnstone, 2005). Ils se sont attachés à suivre en microscopie électronique l'endocytose du récepteur à la transferrine (TfR) dans des réticulocytes en maturation (les futurs érythrocytes, plus connus sous le nom de globules rouges). D'abord marqué à la surface à l'or colloïdal, le TfR se retrouve dans des endosomes précoces puis des endosomes multivésiculés (MVE). Le marquage se concentre alors dans les microvésicules à

l'intérieur des MVE, tandis qu'il n'est plus présent à la membrane limitante. Les chercheurs observent que certains MVE fusionnent avec la membrane plasmique, et libèrent ainsi dans le milieu extracellulaire les vésicules de 50 à 100 nm portant les TfR marqués avec les billes d'or (**Figure 6**). Plus tard, Johnstone *et al* démontrent que les vésicules ainsi relarguées par les réticulocytes en culture peuvent être récoltées par ultracentrifugation à 100 000 g. Cette sécrétion intervient lors de la maturation des réticulocytes et permet l'excrétion du TfR, mais également de l'acétylcholinestérase (AChE), une enzyme couplée à une ancre GPI. Johnstone *et al* émettent l'hypothèse que la sécrétion des exosomes représenterait pour ces cellules un moyen de se débarrasser de protéines membranaires dont elles n'ont plus besoin et de pallier ainsi la perte des lysosomes qui se produit lors de leur maturation (Johnstone *et al.*, 1987).

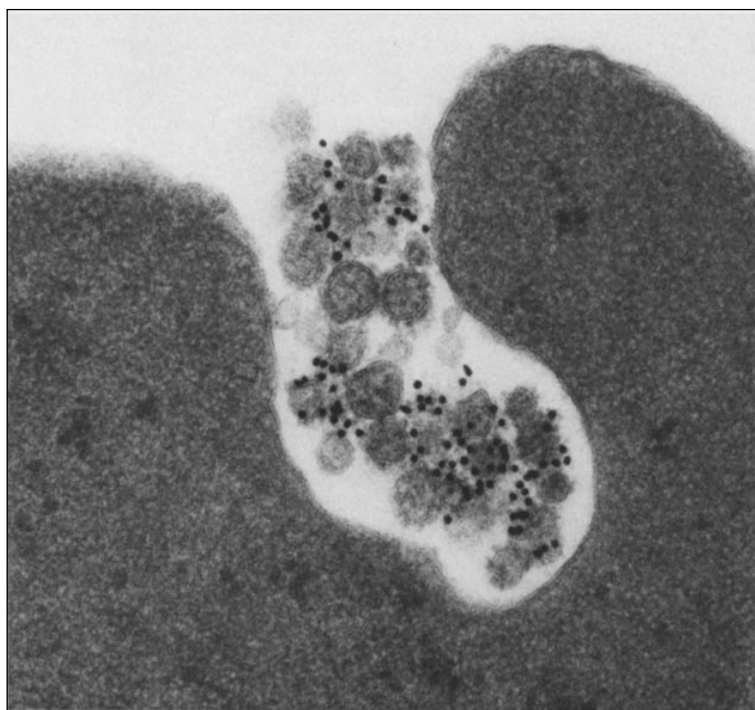


Figure 6 Libération d'exosomes par des réticulocytes en maturation. Après 18h d'incubation en présence d'un anticorps anti-récepteur à la transferrine, le marquage à l'or colloïdal est localisé à la membrane des vésicules intraluminales du MVE. Lorsque ce dernier fusionne avec la membrane plasmique, les exosomes décorés de billes d'or sont sécrétés dans le milieu extracellulaire. Micrographe électronique, grossissement : x 98,625 (Pan *et al.*, 1985).

Depuis leur découverte, les exosomes ont fait l'objet de nombreuses études *in vitro*, particulièrement dans le système immunitaire. Jusqu'à preuve du contraire, il semble que tous les types cellulaires soient capables d'en sécréter.

ii. Et in vivo ?

La grande majorité des travaux sur les exosomes est réalisée sur des cellules en culture. Plus récemment, des vésicules avec des caractéristiques protéomiques, densitométriques et morphologiques similaires à celles des exosomes sécrétés *in vitro* ont été retrouvées dans divers fluides biologiques. Les recherches dans ce domaine visent essentiellement à trouver des marqueurs de pathologies détectables d'une manière non invasive pour les patients. Des exosomes ont été retrouvés dans le liquide séminal collecté dans l'épididyme de bélier adulte (Gatti et al., 2005) et dans le liquide céphalo-rachidien prélevé chez le mouton (Vella et al., 2008). Chez l'homme, la présence d'exosomes a été détectée dans le sang (Caby et al., 2005; Taylor et al., 2006), dans le lait maternel (Admyre et al., 2007), le fluide de lavage broncho-alvéolaire (Admyre et al., 2003), la salive (Ogawa et al., 2008) et l'urine (Pisitkun et al., 2004).

Même si la fusion des MVE avec la membrane plasmique n'a pas encore été observée *in vivo*, la présence dans les fluides biologiques de vésicules rassemblant les caractéristiques exosomales montre que la sécrétion des exosomes n'est pas un artefact de culture comme certains l'avaient envisagé au départ.

II. Formation et fonction des exosomes

1. Biogénèse des exosomes

Les exosomes tirent leur origine des endosomes multivésiculés. La formation des vésicules intraluminales, les futurs exosomes, met en jeu une mécanistique complexe impliquant de nombreux acteurs, à la fois protéiques et lipidiques.

i. Mécanisme ESCRT-dépendant

Au niveau du MVE, le tri des protéines membranaires endocytées exige leur ségrégation « latérale » dans la membrane limitante. Les protéines destinées à la dégradation sont regroupées dans des zones de membrane qui s'invaginent puis se détachent dans le lumen. La reconnaissance de ces protéines, leur tri et la formation des vésicules sont étroitement liés et font appel à de nombreuses interactions moléculaires.

La majorité des protéines destinées à la dégradation sont ubiquitinylées (ajout d'une ubiquitine sur une lysine par une ubiquitine-ligase), c'est notamment le cas du récepteur à l'EGF. Les parties

cytosoliques ubiquitinylées de ces protéines dépassent à la surface de l'endosome et catalysent la formation séquentielle de complexes protéiques appelés ESCRT (*endosomal sorting complexe required for transport*). Les ESCRT sont responsables de la déformation et de la scission de la membrane en vésicules vers la lumière de l'endosome. L'internalisation des cargos dans ces vésicules permet d'une part d'isoler les récepteurs de leurs effecteurs cytosoliques, contribuant à stopper leur signalisation, et d'autre part à les mettre directement en contact avec les hydrolases acides après fusion des MVE avec les lysosomes (Acconcia et al., 2009).

Pour autant, toutes les protéines endocytées dont l'adressage aux ILV met en jeu la machinerie ESCRT ne sont pas ubiquitinylées. Certains cargos tel le récepteur à la transferrine dans les érythrocytes et certains virus comme le VIH peuvent avoir accès aux ILV en s'associant aux protéines ubiquitinylées ou en se liant aux composants ESCRT en aval (Geminard et al., 2004 ; Strack et al., 2003 ; Stuchell et al., 2004).

Les premières études sur le rôle joué par les ESCRT dans le système endosomal ont été faites à partir de l'observation du phénotype des mutants de la voie de dégradation chez *S. Cerevisiae*. Les mutants des gènes ESCRT ont un phénotype commun dit « de classe E ». Ce phénotype est caractérisé par une accumulation des cargos à la surface d'un endosome aberrant, rempli de membranes et incapable de fusionner avec la vacuole, l'équivalent du lysosome chez la levure (Raymond et al., 1992 ; Rieder et al., 1996). Tous ces complexes protéiques étant conservés chez les métazoaires, il existe une nomenclature chez la levure (Vps de classe E, *vacuolar protein sorting*) et chez les eucaryotes supérieurs (CHMP, pour *Charged multivesicular body protein*), qui sont répertoriés dans le Tableau 2 (d'après Hurley and Hanson, 2010).

Il existe trois gros complexes : ESCRT I (Katzmann et al., 2001), ESCRT II (Babst et al., 2002b) et ESCRT III (Babst et al., 2002a). Le groupe Hrs/STAM est considéré aujourd'hui comme un complexe ESCRT 0, qui est chargé de reconnaître les ubiquitines sur les protéines et d'amorcer l'assemblage des complexes suivants (Bilodeau et al., 2002 ; Katzmann et al., 2003). Les différents complexes agissent de manière séquentielle :

- Le phospholipide PI(3)P présent dans la membrane des endosomes stabilise l'amarrage des complexes ESCRT, en interagissant avec le complexe ESCRT 0 par un domaine de liaison spécifique FYVE chez Hrs (Misra and Hurley, 1999 ; Raiborg et al., 2001b). Hrs (*hepatocyte receptor tyrosine kinase substrate*) interagit avec l'ubiquitine et avec la chaîne lourde de la clathrine au niveau de son extrémité C-terminale (Raiborg et al., 2001a). Cette interaction permet à la fois le recrutement de la clathrine au niveau des endosomes précoces, et la séquestration de Hrs et de son cargo dans des micro-domaines

membranaires. Une fois les cargos rassemblés, ESCRT 0 permet le recrutement du reste de la machinerie ESCRT à ces domaines.

- Le complexe I se forme à partir du recrutement de Tsg101 à la membrane de l'endosome par Hrs (Bache et al., 2003). Les complexes II et III s'assemblent ensuite par une cascade d'interactions protéiques. La formation préalable des complexes I et II semble nécessaire à la formation ultérieure des vésicules internes par les ESCRT III. La déplétion en Tsg101 (ESCRT I) par des siRNA dans les BHK diminue de 40% la formation des vésicules intraluminales (Falguieres et al., 2008). Les ESCRT forment ainsi un engrenage qui lie la reconnaissance des protéines à dégrader à la formation de vésicules vers lesquelles elles sont entraînées.
- ESCRT I et ESCRT II se concentrent au niveau du cou (*neck*) du bourgeon où ils créent une barrière de diffusion à la membrane empêchant ainsi la sortie du cargo indépendamment d'ESCRT 0. La déformation membranaire est réalisée par le complexe ESCRT III et comporte une différence remarquable avec la dynamine, qui a un rôle analogue lors de la scission de la vésicule d'endocytose. ESCRT III permettrait la scission en agissant *par l'intérieur* du cou de la vésicule en formation, tandis que la dynamine agit *par l'extérieur* en se resserrant autour de la membrane (Wollert and Hurley, 2010). De plus, Le complexe ESCRT III recrute les désubiquitinyases qui clivent l'ubiquitine des protéines cargos avant leur envoi dans les vésicules intraluminales. La dissociation du complexe ESCRT III nécessite à terme l'action de l'ATPase Vps4/SKD1, de la famille des AAA-ATPases (*ATPase associated with diverse cellular activities*), qui est recrutée à la membrane endosomale par son interaction avec CHMP3 et CHMP2 (Babst et al., 1998 ; Saksena et al., 2009).

En résumé, ESCRT 0 serait recruté aux endosomes précoces riches en PI(3)P via le domaine FYVE de Hrs. Il concentrerait ensuite les cargos dans des micro-domaines membranaires formés de manteaux plats de clathrine. Il recruterait alors ESCRT I et ESCRT II aux bords de ces domaines pour piéger le cargo dans le bourgeon. La vésiculation et la scission de la membrane au niveau du cou par ESCRT III aboutirait à la libération de la vésicule dans la lumière de l'endosome (Figure 7).

L'implication des différents complexes ESCRT dans la formation des vésicules intraluminales, les futurs exosomes, expliquerait pourquoi des protéines comme Tsg101 ou encore CHMP4B se retrouvent dans les analyses protéomiques d'exosomes sécrétés par différents types cellulaires (<http://www.exocarta.org>).

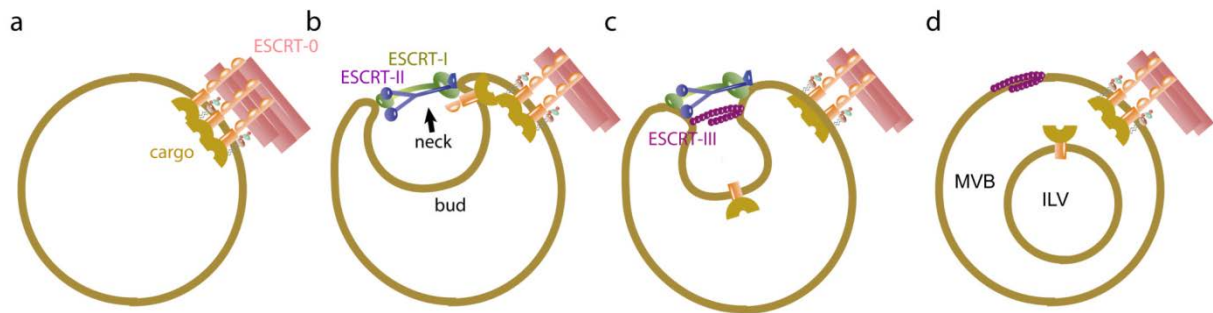


Figure 7 Modèle moléculaire de la biogénèse des vésicules intraluminales par les ESCRT a. assemblage d'ESCRT 0 et rétention du cargo ; b. ESCRT I et II, par des sites de fixation à la membrane écartés, participent à la déformation membranaire ; c. ESCRT III est responsable de la scission de la vésicule ; les ILV s'accumulent dans le lumen tandis qu'ESCRT III est recyclé par Vps4 (Wollert and Hurley, 2010).

Tableau 2 Nomenclature des protéines des complexes ESCRT et des protéines qui leur sont associées. AAA : ATPases Associated with a variety of cellular Activities, AIP: Alg2 interacting protein 1, AMSH: Associated molecule with SH3 domain of STAM , Bro: BCK1-like resistance to osmotic shock protein 1, CHMP: Charged MVB proteins, or chromatin modifying protein, Did: Doa4 independant degradation, Doa: darkener of apricot, EAP: eIF4E associated protein, HRS: hepatocyte growth factor HGF) regulated tyrosine-kinase substrate, PI3P : Phosphatidyl Inositol 3-phosphate, Rsp: reverse SPT phenotype protein, SNF: sucrose non fermenting, SKD: Suppressor of K⁺ transport growth defect 1, UBP: Ubiquitin binding protein, USP: ubiquitin specific procesing protease, Vps: Vacuolar protein Sorting. (adapté de (Hurley and Hanson, 2010)).

Complexe	Levure	Humain	Fonction proposée
ESCRT 0	Vps27	HRS	Interaction avec le PI3P et les cargos via l'ubiquitine ; la clathrine et ESCRT I
	Hse1	STAM1, STAM2	Interaction avec Hua1, Rsp5 et l'ubiquitine
ESCRT I	Vps23	Tsg101	Interagit avec les cargos (ubiquitine) et Vps27 (ESCRT 0)
	Vps28	Vps28	Assemblage avec ESCRT II (Vps36)
	Vps37	Vps37A, B, C, D	Se fixe aux membranes
	Mvb12		Stabilise les oligomères d'ESCRT I en se fixant à ses sous-unités
ESCRT II	Vps22	EAP30, SNF8	Se fixe aux membranes, interagirait avec les cargos et PI3P
	Vps25	EAP20	Recrute ESCRT III via son interaction avec Vps20
	Vps36	EAP45	Assemblage avec ESCRT I (Vps28)
ESCRT III	Vps20	CHMP6	Initie l'assemblage d'ESCRT III à la membrane du MVE (via Snf7), initie la scission
	Vps32/Snf7	CHMP4A, B, C	Déformation et <u>scission</u> de la membrane ;
	Vps2/Did4	CHMP2A, B	CHMP2A et B recrutent Vps4, désassemblage du complexe ESCRT III
	Vps24	CHMP3	
Modulateurs/ adaptateurs	Vps4	VPS4A,B/ SKD1	AAA-ATPase, désassemblage et recyclage des ESCRT
	Vps31/Bro1	Alix/AIP1	Recrute Doa4, interagit avec ESCRT I et III (Snf7 pour la scission)
	Vps60/Mos10	CHMP5	Interagit avec Vta1 (LIP5)
	Vps46/Did2	CHMP1A, B	Recrute Vps4
	Vta1	LIP5	Régulateur positif de Vps4
Ubiquitine-ligase	Rsp5	Nedd4	Ubiquitylation des cargos
Désubiquitinyases	Doa4	UBPY/USP8	Désubiquitinylation des cargos
	Ubp7	AMSH	Désubiquitinylation des cargos

ii. Mécanismes ESCRT-indépendants

La machinerie ESCRT intervenant dans le tri de protéines qui sont ubiquitinylées ou non, pourrait paraître indispensable à la formation des ILV. Pourtant, plusieurs groupes ont démontré l'existence de voies alternatives de bourgeonnement membranaire au niveau du MVE ne faisant pas intervenir les complexes ESCRT.

En 2006, le groupe de Michael S. Marks s'intéresse à la répartition des cargos protéiques dans les ILV des cellules pigmentées. En utilisant des siRNA et des mutants, ils démontrent que l'adressage de la protéine Pmel17 dans les ILV puis son transport dans les mélanosomes (organelles parents des lysosomes qui dérivent des MVE) auraient lieu de manière ubiquitine-indépendante mais également ESCRT-indépendante (Theos et al., 2006). Par ailleurs, ils montrent que cette protéine transmembranaire contient dans sa partie cytosolique une séquence (son domaine luminal) qui est nécessaire et suffisante à son trafic dans les ILV. A l'époque, ils discutent de la possible participation des lipides dans ces mécanismes de regroupement et de tri. En 2003 déjà, les travaux d'Aude de Gassart et ses collaborateurs démontraient la présence de microdomaines lipidiques dans les membranes exosomales et suggéraient leur participation dans la formation des vésicules (de Gassart et al., 2003). Plus récemment, Van Niel et al ont démontré que la tétraspanine CD63 participe au tri du domaine luminal de la Pmel (*pigment cell-specific type I integral membrane protein*) de manière ESCRT-indépendante mais pas au tri des cargos traditionnellement ESCRT-dépendant (van Niel et al., 2011). Les tétraspanines sont des protéines à quatre domaines transmembranaires qui ont la capacité de se multimériser de façon homo ou hétérotypique, pour former des larges plateformes appelées TEM (*tetraspanin-enriched microdomain*) qui lient le cholestérol et l'actine (Delaguardie et al., 2004). Elles sont particulièrement enrichies dans les radeaux lipidiques présents à la membrane des exosomes (Wubbolts et al., 2003). Ainsi, les tétraspanines, associées aux radeaux lipidiques, pourraient déformer les membranes de l'endosome et participeraient au tri des protéines vers la voie exosomale.

En 2008, Trajkovic et al proposent un mécanisme de vésiculation des MVE ESCRT-indépendant qui met en jeu un sphingolipide particulier, la céramide (Trajkovic et al., 2008). Pour ce faire, ils examinent le trafic de la protéine protéolipide PLP dans la lignée d'oligodendrocytes Oli-neu. Ces cellules contiennent des MVE et sécrètent des exosomes contenant la PLP. En microscopie confocale, ils observent que la PLP colocalise avec le glycosylphosphatidylinositol (GPI) et la flotilline-2, des marqueurs des radeaux lipidiques. A *contrario*, la PLP ne colocalise pas avec Hrs ou l'EGF-R. Ces observations laissent penser que les protéines PLP se regroupent dans des microdomaines membranaires du MVE distincts de ceux contenant l'EGF-R, suggérant des mécanismes de

vésiculation différents. En utilisant des RNAi ou des mutants dominants négatifs des différents complexes ESCRT, les auteurs démontrent que cette machinerie moléculaire n'intervient pas dans le trafic endosomal de la PLP et la biogénèse des exosomes PLP-positifs. En revanche, l'inhibition de la sphingomyélinase nSMase (*neutral sphingomyelinase*) provoque une réduction importante de la présence de PLP dans la lumière des endosomes et diminue également la production d'exosomes PLP-positifs. Or, la sphingomyélinase est une enzyme qui clive la sphingomyéline en céramide. Il a été démontré que les céramides provoquent un regroupement des radeaux lipidiques en de larges plateformes qui rassemblent les protéines en « *clusters* » (Holopainen et al., 1998 ; Nurminen et al., 2002). De plus, les céramides sont des lipides qui ont une forme de cône, et dont la présence pourrait incurver la membrane et aboutir à la formation des ILV comme semble le faire un autre lipide en forme de cône, le LBPA, qui induit la formation de vésicules internes dans les liposomes (Matsuo et al., 2004). Enfin, l'équipe de Mikael Simons achève sa démonstration d'un mécanisme ESCRT-indépendant par des expériences *in vitro* d'incubation de la nSMase avec des GUV (*Giant Unilamellar Vesicles*) ce qui provoque effectivement la formation de microvésicules dans le lumen.

Dans une étude sur des GUV dont ils ont fait varier la composition lipidique, Bacia *et al* ont montré que la présence de différents stérols modifie profondément la capacité des lipides à se séparer en phase ordonnée et influence ainsi la courbure membranaire. Certaines compositions lipidiques induisent la vésiculation des GUV vers l'extérieur, et d'autres vers l'intérieur. Ces résultats montrent que les lipides à eux-seuls peuvent déformer les membranes (Bacia et al., 2005).

Pour valider l'existence de mécanismes de biogénèse des ILV indépendants de la machinerie ESCRT, Stuffers *et al* sont parvenus à inactiver simultanément quatre protéines ESCRT : Hrs (ESCRT 0), Tsg101 (ESCRT I), Vps22 (ESCRT II) et Vps24/CHMP3 (ESCRT III) dans des lignées cellulaires humaines (HeLa et Hep-2) abolissant le fonctionnement de ces quatre complexes (Stuffers et al., 2009). Ils ont alors analysé la morphologie de ces cellules 4XKO en microscopie confocale et électronique. De manière surprenante, même si ces cellules présentent une altération importante de leurs compartiments endocytaires, ces derniers, identifiés à l'aide de marqueurs spécifiques (EEA1, CD63, LBPA, Lamp2) sont toujours bien distincts les uns des autres. En outre, la quadruple déplétion d'ESCRT entraîne une accumulation spectaculaire d'ubiquitine et de la protéine p62 (*polyubiquitin-binding autophagy-related*), qui colocalisent partiellement avec EEA1 dans les mêmes structures. Ensuite, en se basant sur les travaux de White *et al*, Susanne Stuffers et ses collaborateurs démontrent que l'inactivation de la machinerie ESCRT inhibe la formation de MVE induite par l'EGF mais n'empêche pas la biogénèse de MVE EGF-indépendants. En effet, observées en microscopie électronique, les cellules 4XKO présentent des MVE élargis contenant des vésicules intraluminales hétérogènes par leur taille et leur forme. Même si ces MVE semblent aberrants, cela signifie tout de

même que des ILV ont été formées indépendamment des complexes ESCRT. Par contre, cette quadruple inactivation d'ESCRT inhibe l'internalisation de l'EGF-R dans ces ILV suggérant que ce dernier est uniquement adressé dans des vésicules intraluminales formées de manière ESCRT-dépendante. L'ensemble de ces résultats les a conduits à proposer un modèle de biogénèse des MVE « à choix multiple » reproduit dans la **Figure 8** (Stuffers et al., 2009).

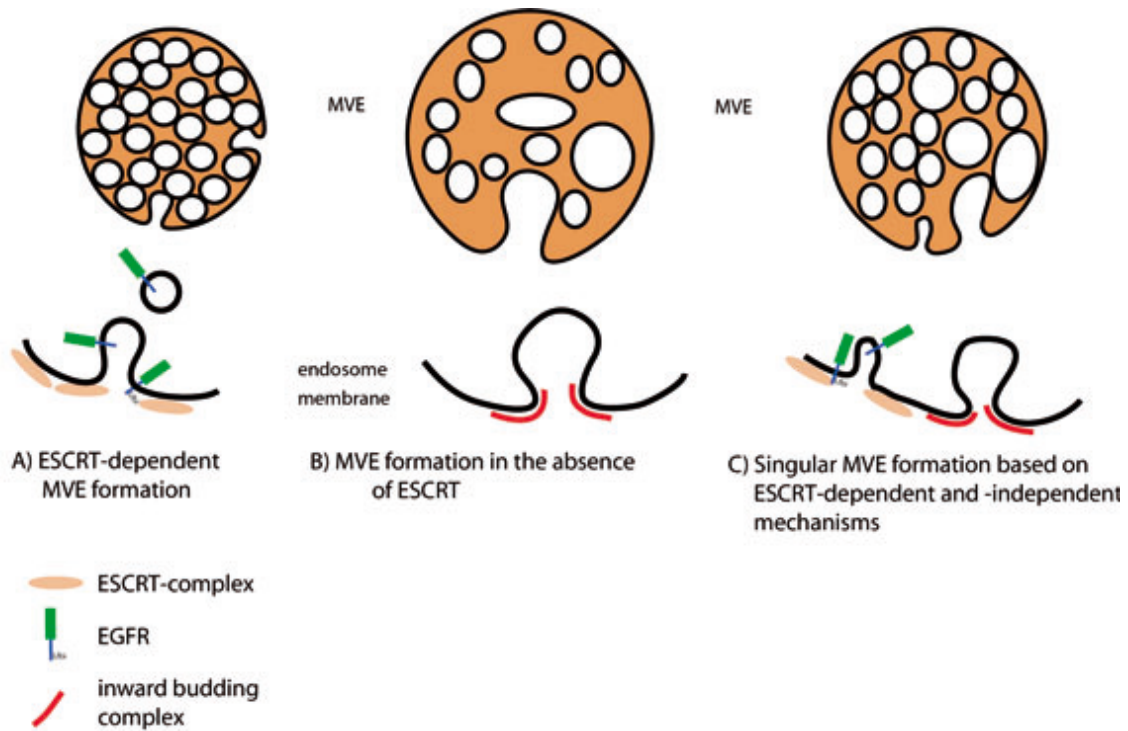


Figure 8 Modèles proposés de biogénèse des MVE. A) en présence des ESCRT, les MVE contiennent des ILV homogènes dans lesquelles se retrouvent des récepteurs tels que l'EGF-R. B) en absence d'ESCRT fonctionnels, il y a tout de même formation de MVE par un mécanisme alternatif produisant des ILV hétérogènes. C) il n'est pas exclu que les deux mécanismes ESCRT-indépendant et ESCRT-dépendant fonctionnent en parallèle (Stuffers et al., 2009).

iii. Alix, la protéine aux multiples visages

Découverte en 1999, Alix (Alg2 Interacting Protein X, Bro1 chez la levure) interagit de manière calcium-dépendante avec Alg2 (Apoptosis Linked Gene 2), une protéine intervenant dans l'apoptose (Missotten et al., 1999). Alix est impliquée via la formation d'un complexe avec Alg2 dans le contrôle de la mort cellulaire induite par le calcium (Trioulier et al., 2004) et la mort programmée des motoneurones durant le développement de l'embryon de poulet (Mahul-Mellier et al., 2006).

Alix est une protéine cytosolique multifonction qui semble jouer un rôle dans la formation du MVE, notamment en interagissant avec les complexes ESCRT. Son extrémité C-terminale comprend un domaine riche en proline (PRD), site de fixation à des endophilines, à la protéine CIN85 (Cbl-interacting protein of 85 kDa) et à Tsg101 (ESCRT I) tandis que son extrémité N-terminale comprend un domaine d'interaction avec CHMP4 (ESCRT III) (Sadoul, 2006). Toutes ces protéines sont des régulateurs connus du trafic endo-lysosomal. Alix se lie à Tsg101 et CHMP4 durant la vésiculation de l'endosome mais sa fonction exacte au sein de la machinerie ESCRT n'est pas bien déterminée. Alix pourrait jouer le rôle de plateforme de recrutement des ESCRT via son interaction avec Tsg101 (Falguieres et al., 2008). Alix pourrait également, via son interaction avec CHMP4, réguler l'assemblage/désassemblage du complexe ESCRT III comme cela a été montré chez la levure (Wemmer et al., 2001).

Ensuite, la protéine Alix peut être reliée à la biogénèse du MVE via son interaction avec le LBPA, lyso-bis-phosphatidic acid également appelé BMP (bis monoacylglycérol phosphate). Il a été montré que la présence de LBPA sur des liposomes préparés avec une composition proche des endosomes tardifs, induit la formation de vésicules intraluminales, à condition que le lumen des liposomes soit plus acide que l'extérieur (gradient 5,5-7) (Matsuo et al., 2004). L'ajout d'Alix sur ces liposomes riches en LBPA inhibe fortement la génération des ILV. La courbure membranaire induite par le LBPA serait sous le contrôle d'Alix. Dans des cellules BHK, la déplétion d'Alix par des siRNA réduit le nombre d'endosomes multilamellaires (endosomes tardifs) et réduit également la présence de LBPA et de cholestérol sur les endosomes. En microscopie électronique, les endosomes apparaissent dépourvus de vésicules intraluminales (Chevallier et al., 2008). La protéine Alix semble donc être impliquée dans des mécanismes de formation des ILV ESCRT-indépendants en régulant la présence à la fois du LBPA et du cholestérol dans la membrane des endosomes.

Très récemment, il a été publié qu'Alix interviendrait dans la biogénèse des exosomes au sein d'un complexe tripartite syndécane-synténine-Alix (Baietti et al., 2012). Les syndécanes sont des protéines transmembranaires ubiquitaires couplées aux sulfates d'héparane de manière covalente. Le sulfate d'héparane étant un glycosaminoglycane (GAG) de la matrice extracellulaire, le couple syndécane-

sulfate d'héparane forme ce que l'on appelle un protéoglycane. Les syndécanes interagissent par ailleurs avec la synténine, une petite protéine cytosolique qui se fixe à Alix via son extrémité N-terminale. Dans cette étude, il est montré que syndécane, synténine et Alix se retrouvent dans les exosomes (identifiés avec CD63 et Hsp70), que la surexpression de la synténine augmente la sécrétion d'exosomes et que cet effet est dépendant d'Alix. *A contrario*, la répression des syndécanes, d'Alix ou de la synténine provoque une diminution de la sortie d'exosomes. En revanche, les auteurs notent l'existence d'une sous-population d'exosomes marqués par la Flotilline-1 qui ne sont pas affectés par le complexe Alix-synténine-syndécane. Ce complexe tripartite agirait au niveau de l'endosome après agglomération (*clustering*) des syndécanes provoquée par leur GAG, le sulfate d'héparane.

Ceci n'est pas sans rappeler une étude de Fang *et al* sur la lignée Jurkat T qui montrait que la simple oligomérisation des protéines dans une bicouche lipidique influençait leur envoi dans les vésicules formées à partir de domaines endosomaux (*endosome-like*) présents à la membrane plasmique (cf. [Tableau 1](#)). Pour cela, ils ont étudié le comportement de la protéine TyA de la levure *S. Cerevisiae* surexprimée dans les Jurkat T. Cette protéine soluble s'oligomérisait dans le cytosol, et sous cette forme elle n'est pas sécrétée. En revanche, si un groupement acyl lui permettant de s'insérer dans les membranes est greffé à TyA, cette protéine s'oligomérisait alors au niveau de la membrane plasmique. L'oligomérisation de TyA la dirige alors dans des vésicules bourgeonnant à partir de la membrane plasmique. Même si dans cette étude, il s'agit d'un bourgeonnement n'ayant pas lieu à la membrane des endosomes, ces résultats concordent avec ceux de Baietti *et al* montrant que l'oligomérisation de cargo dans une bicouche lipidique peut jouer un rôle dans son tri vers les vésicules, et donc potentiellement dans la formation même de la vésicule ([Fang et al., 2007](#)).

Enfin, Baietti *et al* montrent que la synténine recruterait, via Alix, CHMP4B (ESCRT III) pour induire la vésiculation de la membrane endosomale, et que la scission de la vésicule intraluminale nécessiterait VPS4. Ainsi, les processus de courbure et de scission de membrane qui adressent les protéines syndécane, synténine et Alix dans les ILVS (et donc les exosomes) impliquent les complexes ESCRT. Ces travaux suggèrent l'implication d'Alix dans la biogénèse d'exosomes contenant les protéines syndécanes et synténines.

Les « multiples personnalités d'Alix » ([Odorizzi, 2006](#)) font d'elle une protéine adaptatrice impliquée dans la biogénèse des exosomes par des mécanismes à la fois ESCRT-dépendants et indépendants.

2. Mécanismes de libération

La libération des exosomes dans le milieu extracellulaire implique le transport de l'endosome multivésiculé à proximité de la membrane plasmique, son amarrage puis sa fusion. Dans la voie endocytaire, de multiples étapes de fusion membranaire sont mises en jeu, comme la fusion de la vésicule d'endocytose avec l'endosome précoce, ou encore la fusion des MVE avec les lysosomes ou avec la membrane plasmique. Peu d'éléments sur la fusion entre MVE et la membrane plasmique sont connus aujourd'hui, mais il est fort probable que les mécanismes moléculaires mis en jeu soient similaires à ceux des autres événements de fusion qui se produisent dans la voie endolysosomale.

La fusion membranaire nécessite d'abord une étape de rapprochement, puis d'amarrage spécifique des membranes avant l'étape de fusion à proprement parler. Ces étapes font appel à des protéines du cytosquelette (actine, tubuline), des moteurs moléculaires (kinésines) et sont initiées et contrôlées par les protéines Vps de classe C et celles de la famille des GTPases Rab ([Tableau 3](#)), tandis que la fusion membranaire elle-même est réalisée par les SNARE.

i. Implication des Rabs

Les Rab (*Ras-related in brain*) sont des petites GTPases (Guanosyl tri-phosphatases) monomériques de 20 à 25 kDa qui font partie de la super-famille des Ras (*Ras sarcoma*). Elles oscillent entre deux états, un état actif lié au GTP (Guanosine tri-phosphate), et un état inactif après hydrolyse du GTP en GDP (Guanosine di-phosphate). Les Rabs comptent une soixantaine de membres et sont présentes à la surface cytosolique des compartiments intracellulaires. Par leurs interactions indirectes avec des composants de manteau (*coating*), des moteurs moléculaires et des SNAREs, les GTPases Rab participent à presque tous les processus de trafic de membranes dans les cellules eucaryotes et notamment le trafic de vésicules ([Figure 9](#) d'après ([Stenmark, 2009](#))). Chaque Rab est associée à un compartiment spécifique et si un même compartiment présente à sa membrane différentes Rabs, elles se localiseront dans des microdomaines membranaires différents, appelés *Rab domains*.

Tableau 3 GTPases Rab et composants des complexes Vps-C régulant la fusion des compartiments endo-lysosomaux.

HOPS: homotypic fusion and vacuole protein sorting, CORVET: class-C core vacuole/endosome tethering complex, Pep: carboxypeptidase Y-deficient, GDI: Guanosine nucleotide dissociation inhibitor, Sec: secretory, AAA: ATPase associated with various cellular activities, NSF: N-éthylmaléimide sensitive factor, SNAP: N-éthylmaléimide-sensitive factor attachment protein (d'après (Nickerson et al., 2009)).

Facteur	Levure	Humain	Fonction
Rab GTPases	Vps21	Rab5	Identité membranaire des endosomes précoces, régulateur de leur fusion
	Ypt7	Rab7	Identité membranaire des endosomes tardifs, régulateur de leur fusion
Vps-C (Cœur)	Vps11/Pep5	hVps11	
	Vps16	hVps16	
	Vps18/Pep3	hVps18	Activité ubiquitine-ligase <i>in vitro</i>
	Vps33	hVps33A, B	Potentiellement chaperonne pour les protéines SNARE
HOPS	Vps39/Vam6	hVps39/hVam6	Facteur d'échange du GDP (GEF) pour Ypt7/Rab7
	Vps41/Vam2	hVps41/hVam2	Effecteur de Ypt7/Rab7
CORVET	Vps3	hVps39/hVam6	
	Vps8	hVps8	Effecteur de Vps21/Rab5
Autres	Yck3	Casein kinase	Protéines kinase régulée par Vps21/Rab5, régule négativement la fusion en phosphorylant Vps41 et Vam3
	Gyp7		GTPase activating protein (GAP) pour Yp7/Rab7
	Gdi1/Sec19	GDI	Chaperonne des Rab
	Sec18	NSF	AAA ATPase pour le désassemblage des SNARE
	Sec17	A-SNAP	Adaptateur de NSF sur le complexe SNARE

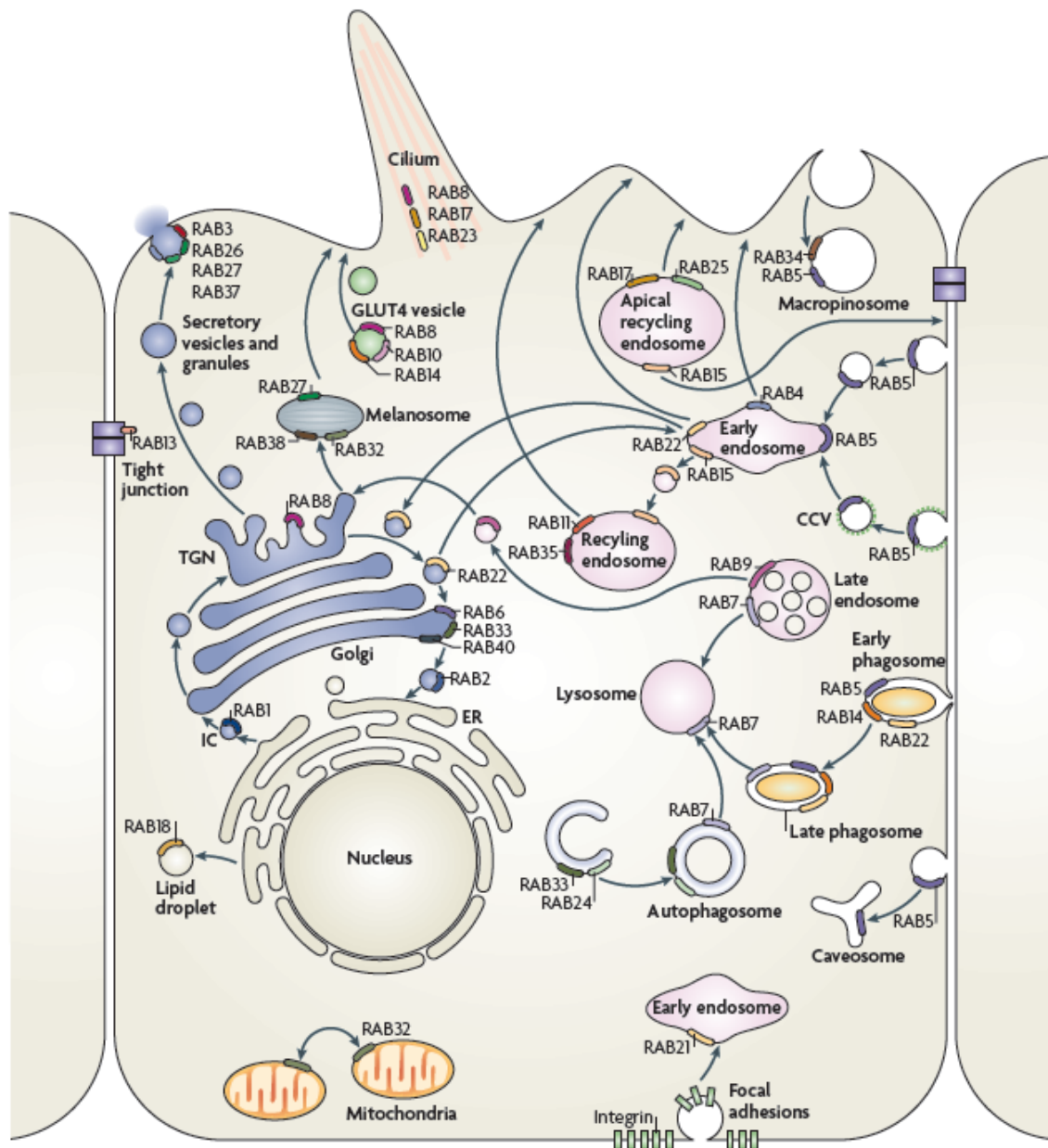


Figure 9 Localisation subcellulaire des GTPases Rab dans une cellule épithéliale. Les différentes Rabs interviennent au niveau de compartiments intracellulaires variés. Par exemple, Rab6, Rab33 et Rab40 sont associées à l'appareil de Golgi où elles participent au trafic trans-golgien. Lorsque plusieurs Rabs sont associées à un même compartiment, elles sont localisées dans des domaines membranaires différents appelés *Rab domains* (Stenmark, 2009).

Selon le type cellulaire dans lequel a été réalisée l'étude, différentes Rabs ont été impliquées dans la biogénèse et la sécrétion des exosomes : Rab11 dans la lignée érythrocytaire K562 humaine, Rab27 a et b dans des cellules HeLa (carcinome utérin humain) et Rab35 dans la lignée Oli-neu (lignée oligodendrogliale murine).

La petite GTPase Rab11, qui est un marqueur des endosomes de recyclage, a été détectée dans des exosomes sécrétés par des cellules dendritiques et dans des prostasomes (Llorente et al., 2007; Thery et al., 2001). Bien que Rab11 participe principalement à la fusion des endosomes de recyclage avec la membrane plasmique, il semblerait qu'elle joue également un rôle dans la libération des exosomes : elle favoriserait en effet la fixation et la fusion des MVE à la membrane plasmique d'une manière calcium-dépendante, permettant par la suite le largage des exosomes dans le milieu extracellulaire (Savina et al., 2005; Savina et al., 2002). Dans les cellules épithéliales polarisées, Rab11 pourrait collaborer avec la protéine syntaxine-3 afin de favoriser l'exocytose apicale des exosomes (Lakkaraju and Rodriguez-Boulan, 2008).

En Janvier 2010, Clotilde Théry et son équipe réalisent, dans des cellules HeLa, un criblage des GTPases Rabs potentiellement impliquées dans la sécrétion exosomale. De ce crible, basé sur une bibliothèque de shRNAs lentiviraux visant 59 membres de la famille des Rab, sont sorties les protéines suivantes : Rab2b, Rab9a, Rab5a, Rab27a et Rab27b. Ainsi, le *knock-down* de ces cinq Rabs inhibait la sécrétion exosomale sans modifications majeures de la sécrétion de protéines solubles par la voie de sécrétion classique. Il est à noter que dans cette étude, Rab11 ne semble pas impacter sur la sécrétion des exosomes par les cellules HeLa. En revanche, l'extinction de Rab27a et celle de Rab27b inhibent la sortie des exosomes sans en modifier la composition en protéines. Chose intéressante, ces deux Rabs n'ont pas la même localisation cellulaire et elles agiraient à des niveaux différents dans la biogénèse des exosomes. En effet, Rab27b présente majoritairement une distribution périnucléaire asymétrique au niveau du réseau trans-golgien et ne colocalise que de façon très minoritaire avec les compartiments CD63-positifs ; tandis que Rab27a est de préférence associée aux MVE CD63-positifs. En outre, la suppression de Rab27b entraîne une diminution de la taille des MVE et leur relocalisation autour du noyau alors que l'extinction de Rab27a augmente la taille des MVE CD63-positifs (observation en ME et en microscopie à fluorescence). Même si elles semblent agir à des niveaux cellulaires différents, la suite de l'étude suggère que ces deux Rabs joueraient toutes deux un rôle dans le déplacement et l'amarrage du MVE à la membrane plasmique (Ostrowski et al., 2010). Il est à noter que lors du congrès IWE 2011 (*International Workshop on Exosomes*), C. Théry a mis en garde la « communauté exosomes » sur la reproductibilité de ces résultats selon le type cellulaire dans lequel est effectué le criblage.

Très récemment, cette même équipe a démontré à l'aide de modèles murins que le blocage de Rab27a dans des cellules de carcinome mammaire diminuait la sécrétion d'exosomes (caractérisés par des marqueurs spécifiques : CD63, Tsg101, Alix, Hsc70) mais également la sécrétion de la métalloprotéinase-9 matricielle MMP9 qui, elle, n'est pas associée aux exosomes. Dans leurs expériences *in vivo*, l'inhibition de Rab27a conduit à la diminution de la croissance de la tumeur principale et de la dissémination de métastases (cellules de carcinome mammaire 4T1) mais n'a pas eu d'effet sur une tumeur non-métastatique (carcinome mammaire TS/A). Le blocage de Rab27a réduit la croissance localisée des tumeurs 4T1 et empêche la mobilisation de neutrophiles pro-tumoraux. Cette mobilisation serait induite par la sécrétion d'exosomes Rab27a-dépendante et d'une combinaison spécifique de cytokines et/ou de métalloprotéinases (Bobrie et al., 2012).

Dernièrement, le groupe de Mikael Simons a réalisé un criblage des GAP (*GTPase-activating proteins*, des protéines activant les Rabs GTPases) potentiellement impliquées dans la sécrétion d'exosomes. Cette étude, réalisée sur des cellules Oli-neu qui sécrètent des exosomes contenant la PLP (Kramer-Albers et al., 2007; Trajkovic et al., 2006), a démontré que la famille des protéines TBC1D10 régulait négativement la sortie d'exosomes PLP-positifs. Ils ont ensuite identifié Rab35 comme étant une cible de TBC1D10A-C et ont montré que son extinction diminuait la sécrétion d'exosomes contenant la PLP. Selon cette étude, Rab35 et ses GAP TBC1D10A-C joueraient un rôle dans l'amarrage du MVE à la membrane plasmique. De façon intéressante, les travaux de Sato et al chez *C. elegans* ont montré que la réduction combinée de Rab35 et de Rab11 entraîne une augmentation spectaculaire d'accumulation intracellulaire de cargos endosomaux (Sato et al., 2008). Il semblerait donc que ces deux Rabs soient associées à la fois aux compartiments de recyclage de la voie endosomale mais également aux MVE (Hsu et al., 2010).

L'ensemble de ces études suggère l'implication de différentes Rabs dans la sécrétion des exosomes. Il faut néanmoins garder à l'esprit que les résultats obtenus semblent dépendants du type cellulaire étudié et que modifier les Rabs n'est pas sans conséquence sur les compartiments de la voie endocytaire, avant même l'étape d'arrimage du MVE à la membrane.

ii. Rôle des SNAREs

Les SNAREs (SNAP (*Soluble NSF attachment Protein*) Receptors) sont des protéines présentes au niveau des membranes cellulaires et qui sont impliquées dans la fusion des bicouches lipidiques. Les SNAREs sont historiquement classifiés en deux catégories : les SNAREs vésiculaires (v-SNAREs ou *vesicular associated membrane proteins*, VAMPs), localisés à la membrane du compartiment donneur et les SNAREs cibles (ou *target* en anglais : t-SNAREs), associés à la membrane du compartiment accepteur (Zylbersztejn and Galli, 2011).

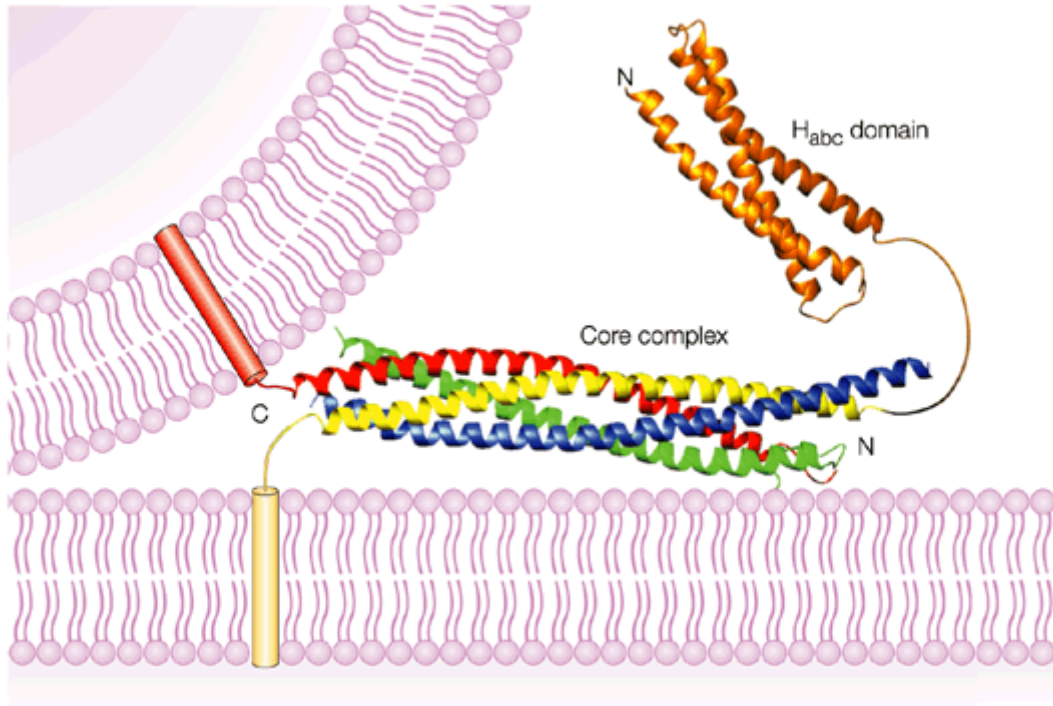


Figure 10 Représentation structurale des protéines SNARE impliquées dans la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique. Le domaine H_{abc} de la syntaxine 1 est coloré en orange alors que les SNARE (SNAP receptor) sont colorés comme suit : synaptobrevine en rouge, syntaxine 1 en jaune, l'extrémité N-terminale de SNAP-25 (*synaptosomal-associated protein of 25 kDa*) en bleu et son extrémité C-terminale en vert. Les cylindres représentent les domaines transmembranaires de la synaptobrevine (insérée dans la membrane de la vésicule) et de la syntaxine 1 (insérée dans la membrane plasmique). La synaptobrevine (v-SNARE) interagit avec les t-SNAREs de la membrane plasmique, la syntaxine et SNAP-25. Cette interaction (*core complex*) permet le rapprochement des membranes et à terme leur fusion. L'image a été obtenue avec le programme MOLMOL (Rizo and Sudhof, 2002).

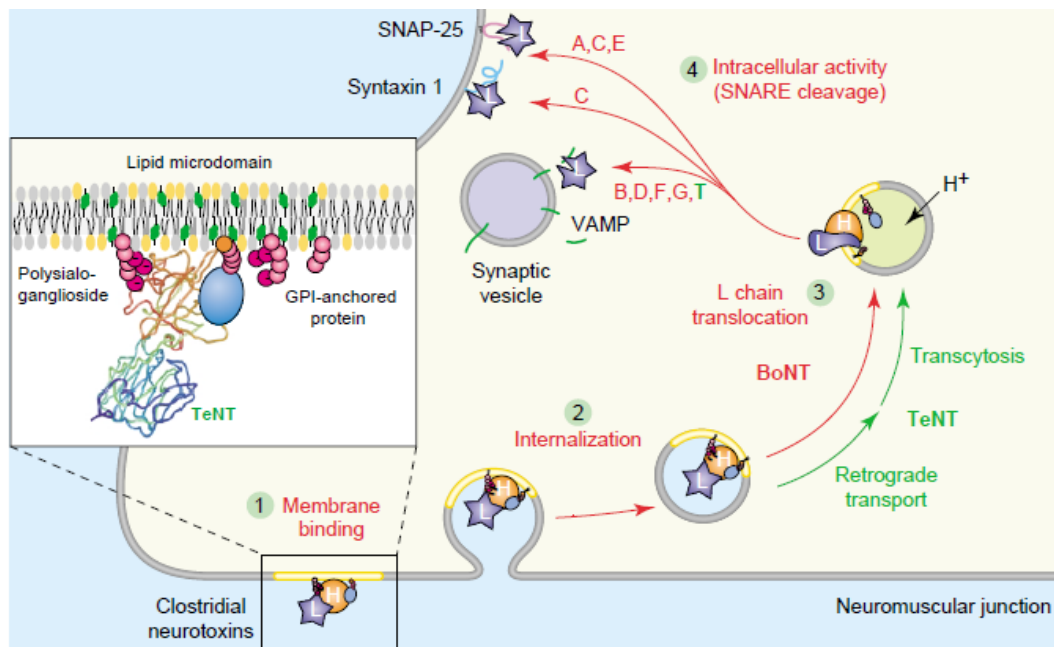


Figure 11 Mécanismes d'action des toxines clostridiales. La toxine du tétanos (TeNT) et les toxines botuliniques (BoNT, sérotypes A-G) procèdent en quatre étapes pour inhiber la libération des neurotransmetteurs : fixation, internalisation, translocation de la chaîne légère responsable de l'activité protéasique et clivage des SNAREs (Lalli et al., 2003).

Les SNAREs contiennent dans leur structure des hélices qui interagissent entre elles pour former des complexes *trans* à 4 hélices parallèles appelées SNAREpin, qui resserrent les membranes l'une contre l'autre, à l'image d'une fermeture éclair. L'intervention de la protéine AAA+ ATPase NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein*) permet ensuite le désassemblage des complexes SNARE et leur recyclage pour d'autres événements de fusion.

Les protéines SNARE ont été découvertes à partir de l'observation du blocage de la libération des neurotransmetteurs par les toxines clostridiales (toxines du tétanos et botulique). Ces toxines ont pour cibles les protéines qui permettent la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique (Figure 10). La toxine tétanique clive la v-SNARE synaptobrevine (VAMP2, *vesicle associated membrane protein 2*), qui interagit normalement avec les t-SNAREs syntaxine et SNAP-25 (*synaptosomal-associated protein of 25 kDa*) au niveau de la membrane plasmique. Ces dernières se trouvent être les cibles de la toxine botulique (Figure 11). La synaptotagmine est un senseur de calcium qui permet la formation du complexe VAMP2-syntaxine-SNAP-25 et donc la libération des neurotransmetteurs lors d'une entrée de calcium induite par la dépolarisation membranaire à l'arrivée d'un potentiel d'action.

Divers complexes SNARE, formés de partenaires différents, sont impliqués dans les événements de fusion qui se produisent entre compartiments intracellulaires, ou entre les compartiments et la membrane plasmique. Ceux impliqués dans la fusion du MVE avec la membrane plasmique conduisant à la libération d'exosomes restent inconnus. En revanche, la capacité de fusion des lysosomes avec la membrane plasmique a été étudiée dans de nombreux types cellulaires, comme les fibroblastes (Martinez et al., 2000), les neurones (Arantes and Andrews, 2006) ou encore les astrocytes en culture (Li et al., 2008). Une des fonctions de cette fusion pourrait être de réparer les déchirements de la membrane plasmique, ou de contribuer à l'apport de membrane nécessaire lors de la pousse neuritique. La fusion des lysosomes avec la membrane plasmique requiert la formation d'un complexe entre la v-SNARE Ti-Vamp (*tetanus toxin-insensitive Vamp*) également dénommée Vamp7, et les t-SNAREs syntaxine 4 et SNAP23 (Rao et al., 2004). La protéine Vamp7 serait impliquée à la fois dans la fusion des lysosomes avec les endosomes tardifs (Mullock et al., 2000) et dans la fusion des lysosomes avec la membrane plasmique, en s'associant dans chaque cas avec des partenaires différents.

Dans la lignée érythrocytaire K562, Vamp7 et l'ATPase NSF (qui catalyse la dissociation du complexe SNARE) ont été impliquées dans la fusion des MVE à la membrane plasmique libérant ainsi des exosomes contenant l'acétylcholinestérase (Fader et al., 2009). Cette étude est la première à impliquer les SNAREs dans la libération des exosomes. D'autres devraient suivre nous permettant de mieux comprendre la mécanistique mise en jeu lors de la fusion du MVE avec la membrane plasmique.

iii. Une sécrétion régulée ?

▪ L'activation cellulaire par un stimulus externe

Les mastocytes sont des cellules granuleuses présentes dans les muqueuses et dans les tissus conjonctifs. Lorsqu'un mastocyte est en contact avec un allergène dont il présente les IgE spécifiques, il dégranule, ce qui libère des médiateurs inflammatoires et des protéases. Il a été démontré que la dégranulation des mastocytes s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion d'exosomes (Laulagnier et al., 2004a; Raposo et al., 1997).

Dans le cas des lymphocytes B, la production d'exosomes serait sous la dépendance de cytokines (Interleukine 4, ou IL-4) et de l'activation de récepteurs de surface (CD40, BCR -*B cell Receptor*-). Les cellules ne sécrètent pas d'exosomes tant que le récepteur de l'IL-4 et la molécule de co-stimulation CD40 ne sont pas activés. La production et/ou la sécrétion des exosomes seraient donc stimulées ici par des contacts intercellulaires, directs ou à distance, qui activent la cellule (Saunderson et al., 2008). La même année, Arita et al ont montré que les contacts intercellulaires entre lymphocytes T et B, ou la stimulation des lymphocytes B par incubation avec des immunoglobulines de type IgM, stimulaient leur production d'exosomes. Au niveau intracellulaire, une inhibition de la voie NFκB, qui est une voie de signalisation commune aux stimuli extracellulaires précédents, réduit la sécrétion de marqueurs exosomaux et des molécules du CMH associées aux exosomes (Arita et al., 2008). Ainsi, la stimulation des lymphocytes par les cytokines ou par contact intercellulaire et l'activation de la voie NFκB impliquée dans la survie et la croissance cellulaire, déclenchent une augmentation de la production des exosomes. Enfin, les lymphocytes T sécrètent des exosomes sous la dépendance de l'activation de leur TCR (*T cell receptor*) (Blanchard et al., 2002).

Dans le laboratoire, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'activité synaptique sur la sécrétion d'exosomes neuronaux.

▪ *Le calcium*

Plusieurs études suggèrent très fortement que le calcium intracellulaire jouerait un rôle dans l'étape de fusion des MVE avec la membrane plasmique.

P2X7R est un récepteur-canal à purines de la famille des P2X. Ces récepteurs ubiquitaires sont présents à la membrane plasmique et sont activés par l'ATP extracellulaire (Rassendren et al., 1997). Leur activation ouvre un canal laissant entrer le calcium et le sodium, ce qui dépolarise la membrane de la cellule et déclenche des mécanismes intracellulaires calcium-dépendants. Ces récepteurs sont impliqués dans de nombreux phénomènes, comme la contraction cardiaque ou le tonus vasculaire. Ils interviennent également dans le système immunitaire, en stimulant la production d'interleukines ou en actionnant la lyse de cellules infectées par des bactéries (Kaczmarek-Hajek et al., 2012). L'activation de ce récepteur par incubation de macrophages en culture avec de l'ATP stimule en 15 minutes la sécrétion d'exosomes. La même expérience réalisée sur des macrophages provenant de souris KO pour le gène de P2X7R ne provoque pas d'augmentation de la sécrétion des exosomes (Qu et al., 2007). Le fait que les exosomes aient été récoltés après des temps relativement courts suggère que l'élévation de la concentration en calcium cytosolique permet d'augmenter directement la fusion des MVE existant dans la cellule avec la membrane plasmique.

En outre, la régulation de la sécrétion exosomale par le calcium a été démontrée dans les cellules du trabéculum de l'œil. Ces cellules, situées entre la cornée et l'iris, libèrent des exosomes contenant une protéine appelée myociline, dont des mutations sont en cause dans les cas de glaucomes. L'incubation de ces cellules mises en culture avec de la ionomycine, un ionophore du calcium, provoque une augmentation de la sécrétion d'exosomes (Hoffman et al., 2009). Une élévation du calcium intracellulaire semble donc accroître la production d'exosomes par ces cellules. De même, un traitement de cultures primaires d'oligodendrocytes avec de la ionomycine augmente significativement la sortie d'exosomes contenant la PLP, indiquant que cette sécrétion est régulée par la concentration en calcium cytosolique (Kramer-Albers et al., 2007). Enfin, notre laboratoire a également montré que la dépolarisation de neurones corticaux en culture, qui provoque une entrée massive de calcium, s'accompagne d'une augmentation de la sortie d'exosomes (Faure et al., 2006).

D'autres études se sont également intéressées au rôle du calcium dans la sécrétion des exosomes, mais sur des temps cette fois plus longs. Dans la lignée K562, l'incubation des cellules pendant 7 à 15h avec les ionophores A23187 (spécifique du calcium) ou la monensine (ionophore du Na^+ et du Ca^{2+}) augmente la sécrétion de marqueurs exosomaux, et à l'inverse, l'utilisation du chélateur de calcium intracellulaire BAPTA-AM diminue cette sécrétion. De plus, la thapsigargine, qui bloque la recapture du Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique, augmente la concentration en calcium dans le

cytosol et accroît fortement la sécrétion des exosomes. De même, la fixation de la transferrine sur son récepteur active la phospholipase C, ce qui produit de l'IP3 (Inositol 1, 4, 5-triphosphate) dans le cytosol, provoque la libération de calcium à partir du réticulum et augmente la quantité d'exosomes sécrétés (Savina et al., 2003). Ces *timings* d'expérience ne sont pas forcément compatibles avec le concept de régulation d'un événement *a priori* très rapide. Néanmoins ces travaux permettent d'accentuer l'implication du calcium dans la sécrétion exosomale.

▪ Le cholestérol

La diminution du taux de cholestérol membranaire des endosomes ou l'inhibition de sa biosynthèse (par exemple, par ajout de MCD -*cholesterol-extracting agent*-) stimulerait la libération des exosomes et des prostasomes, vésicules semblables aux exosomes mais sécrétées par les cellules épithéliales de la prostate (Llorente et al., 2007; Stoeck et al., 2006).

En fait, la présence de cholestérol dans les membranes endosomales et surtout son accumulation pourraient accroître le nombre de protéines membranaires Rab7 (petite GTPase) et le recrutement de dynéine et de kinésine (qui régulent le déplacement bi-directionnel des endosomes), diminuant ainsi la mobilité des structures endosomales (Lebrand et al., 2002).

▪ Le stress

La protéine p53 est un facteur de transcription qui déclenche l'expression de nombreux gènes en réponse à divers stress cellulaires comme des dommages causés à l'ADN, ou une déprivation en nutriments. Les gènes cibles de p53 codent pour des protéines capables d'arrêter le cycle cellulaire, de réparer l'ADN ou de déclencher la mort cellulaire. Une irradiation aux rayons γ de cellules tumorales provoque une augmentation de la production de p53 et une élévation radicale de la sécrétion d'exosomes par ces cellules. Les mêmes cellules p53 $-/-$ ne produisent pas d'exosomes, même lorsqu'elles sont irradiées.

P53 régule entre autres l'expression de TSAP6 (*tumour suppressor-activated pathway*), une protéine à six domaines transmembranaires, présente à la membrane des endosomes. Cette protéine interviendrait dans le métabolisme du fer dans les érythrocytes, mais aussi dans la sécrétion de certaines protéines comme la TCTP/HRF (*translationally-controlled tumour protein* ou *Histamine releasing factor*). La TCTP, une fois sécrétée, provoque la libération d'histamine par les polynucléaires et les mastocytes. Une étude menée par Nathalie Amzallag *et al* a montré que la TCTP était sécrétée par la voie exosomale et que la surexpression de TSAP6 augmentait significativement cette sécrétion. De façon intéressante, la protéine TSAP6 est elle aussi retrouvée dans les exosomes (Amzallag et al., 2004). L'activation de p53 en cas de stress cellulaire augmente l'expression de TSAP6, qui en réponse augmente la sécrétion de TCTP dans les exosomes et permet une réponse au stress via la libération

d'histamine par les cellules compétentes (Yu et al., 2006). Lespagnol et ses collaborateurs ont par ailleurs démontré que dans des souris KO TSAP6, la production d'exosomes est fortement compromise (Lespagnol et al., 2008). Plus récemment, Xin Yu et al ont montré que p53 régule également des gènes codant pour des protéines de la voie endocytaire, comme CAV1 (caveolin-1) et CHMP4C (ESCRT III). Dans leurs expériences sur les lignées cellulaires H460 et H1299 (carcinomes pulmonaires humains), la diminution de l'expression de CHMP4C par production de siRNA réduit la production d'exosomes, et la surexpression de CHMP4C dans une lignée p53 -/- restaure la sécrétion d'exosomes. La régulation de la sécrétion des exosomes par p53 en réponse au stress pourrait donc passer par cette voie (Yu et al., 2009).

3. Composition des exosomes

i. Protéines

Les premières analyses en protéomique de la composition exosomale furent réalisées sur des exosomes sécrétés par des cellules dendritiques (Théry et al., 2001). Depuis, les exosomes de nombreux types cellulaires différents ont été analysés en protéomique et les informations obtenues sont compilées sur le site <http://www.exocarta.org> (Mathivanan et al., 2012; Mathivanan et al., 2009). Ces études ont montré que le contenu des exosomes n'est pas aléatoire mais forme un ensemble spécifique de quelques familles de protéines, provenant essentiellement de la membrane plasmique, de la voie endocytaire et du cytosol. En addition d'un lot commun de protéines, les exosomes présentent des protéines spécifiques du type cellulaire qui les sécrète. L'analyse du contenu protéique des exosomes confirme leur origine endosomale d'autant plus que peu ou pas de protéines d'autres compartiments intracellulaires se retrouvent dans les exosomes. En effet, les exosomes ne contiennent pratiquement pas de protéines issues des mitochondries, du noyau, du réticulum endoplasmique et de l'appareil Golgi.

En 2009, Théry et al proposent un schéma récapitulatif des principales protéines trouvées dans les exosomes sécrétés par tous les types cellulaires répertoriés dans la littérature, et retrouvés dans des fluides biologiques (Figure 12 d'après (Théry et al., 2009)). Dans 50% des études sur les exosomes, ont été trouvées :

- des protéines d'adhésion comme le MFG-E8 (*milk fat globule-EGF factor VIII*) et des intégrines
- des tétraspanines telles que CD63, CD81, CD9...
- des molécules impliquées dans la présentation d'antigène : CMH I (et CMH II dans 30% des exosomes répertoriés dans la littérature)
- des protéines chaperonnes : Hsp70, Hsp90
- des molécules du cytosquelette ou associées au cytosquelette : actine, tubuline, protéine ERM (Ezrine, radixine et moésine)

- des protéines de signalisation intracellulaire : Protéine Gα, 14-3-3
- des protéines impliquées dans le trafic membranaire : des GTPases monomériques Rab, et des annexines
- des protéines impliquées dans la voie endocytaire : Alix, CHMP4B, la clathrine, Tsg101 et la flotilline.
- des protéines impliquées dans l'initiation de la synthèse protéique comme EEF1A1 (*Eukaryotic translation elongation factor*)
- des enzymes du métabolisme cellulaire : la pyruvate kinase, la GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-activating protein*).

Parmi les protéines recensées dans les exosomes, on peut distinguer celles qui sont spécifiquement enrichies dans les fractions exosomales par rapport aux autres vésicules sécrétées par les cellules comme Alix, CD63 et Tsg101. Ces protéines sont impliquées dans les mécanismes de formation des ILV à l'intérieur des MVE. Dans les expériences, ces protéines sont classiquement utilisées comme marqueurs exosomaux.

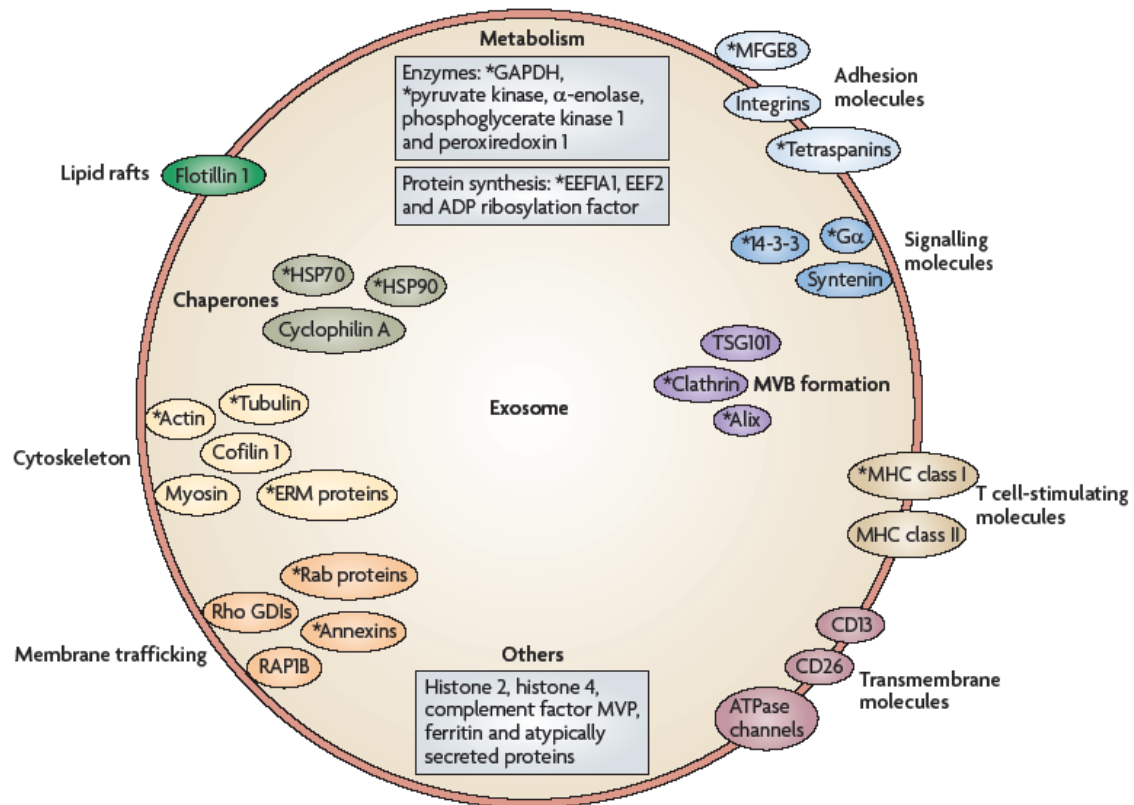


Figure 12 Principales protéines retrouvées dans les exosomes. Les protéines listées ici ont été retrouvées dans environ 30% des exosomes répertoriés dans la littérature (sécrétés par des cellules en culture ou retrouvés dans les fluides biologiques), celles marquées d'un astérisque dans 50%. EEF: Eucaryotic Translation Elongation Factor, ERM: Ezrin, Radixin et Moesin, GAPDH: glyceraldéhyde 3-phosphate dehydrogenase-activating protein, HSP: Heat shock protein, MFG8: Milk fat globule EGF 8 protein, MVB: multivesicular body, MVP: Major Vault protein, RAP1b: RAS related protein 1b, Rho GDI: Rho GDP dissociation inhibitor, TSG101: tumour susceptibility gene 101 (Thery et al., 2009).

De façon intéressante, un même type cellulaire pourrait sécréter différentes populations d'exosomes, cela semble notamment le cas des cellules épithéliales. La capacité des cellules épithéliales à sécréter des exosomes a été pour la première fois décrite à l'aide de cellules épithéliales de l'intestin (van Niel et al., 2001). Depuis, il a été démontré que les cellules épithéliales du rein et de la glande salivaire en sécrètent également (Kapsogeorgou et al., 2005; Pisitkun et al., 2004). Comme mentionné plus haut, les exosomes sont libérés à la fois du côté apical et du côté basolatéral de ces cellules polarisées, disposées en monocouche. Les deux populations d'exosomes libérés partagent des protéines communes (antigène CMH de classe I, tétraspanines potentiellement impliquées dans le processus d'attachement aux cellules cibles, Hsp...) mais aussi des protéines spécifiques. Les exosomes apicaux contiennent de la syntaxine 3 et de la dipeptidase CD26 microsomale qui sont généralement adressées aux membranes apicales. La sécrétion apicale d'exosomes dans la lumière intestinale mais aussi dans l'urine (au niveau de l'épithélium rénal) pourrait être un processus d'élimination de protéines mais surtout un moyen pour ces cellules épithéliales de réguler leur répertoire protéique à travers des rondes successives de relargage d'exosomes et de leur récupération par les cellules voisines. Dans des expériences réalisées sur des cellules épithéliales intestinales (CEI) de la souris, il a été démontré que les exosomes sécrétés basolatéralement étaient enrichis en antigène A33, en molécule Ig-like (spécifique des CEI) et en molécules du CMH de classe II après activation par l'interféron γ . L'antigène A33 et la molécule Ig-like furent également retrouvés dans les ganglions lymphatiques mésentériques de souris, suggérant la migration des exosomes de l'intestin vers les tissus lymphoïdes (Van Niel et al., 2003). Depuis, des études réalisées par Mallegol *et al* et Hundorfean *et al* laissent penser que, *in vitro* et *in vivo*, les exosomes libérés à la surface basolatérale des CEI transportent des antigènes de la lumière de l'intestin vers le système immunitaire sous-jacent (Hundorfean et al., 2007; Mallegol et al., 2007).

En outre, les cellules RBL-2H3 (lignée de mastocytes de rat) sécrèteraient deux populations exosomales distinctes : des exosomes CMHII-positifs enrichis en phospholipides issus des granules et des exosomes tétraspanines-positifs (CD63 et CD81) enrichis en phospholipides d'origine Golgienne. Les exosomes contenant CD63, CMHII et CD81 représenteraient 47%, 32% et 21% respectivement des exosomes totaux sécrétés par ces cellules (Laulagnier et al., 2005).

ii. Lipides

Dans la littérature sur les exosomes, peu de publications portent sur la composition lipidique des exosomes. Néanmoins, les quelques études réalisées l'ont été sur des types cellulaires différents, ce qui a permis de montrer que les exosomes ont un profil lipidique commun mais aussi des spécificités qui semblent dues à leur origine cellulaire. En 1999, Heijnen *et al* démontraient que les exosomes

sécrétés par les plaquettes sanguines présentaient à leur surface de la phosphatidylsérine (Heijnen et al., 1999). Depuis, il est connu que les exosomes contiennent beaucoup de phospholipides insaturés, de phosphatidyléthanolamine et de glycérophospholipides (Subra et al., 2007). Les exosomes sécrétés par la lignée RN de lymphocytes B contiennent des phospholipides, de la sphingomyéline et sont enrichis en gangliosides GM3 et en cholestérol (Mobius et al., 2002; Wubbolts et al., 2003). Ces exosomes ne contiennent pas de LBPA, observation confirmée par Laulagnier *et al* dans une lignée de mastocytes (RBL-2H3). Par contre, ils ne constatent pas un enrichissement particulier en cholestérol par rapport à la membrane plasmique, ce qui pourrait être une caractéristique des exosomes sécrétés par des lymphocytes B. En outre, leurs travaux démontrent que les exosomes contiennent de la phosphatidyléthanolamine dont la répartition entre les deux feuillet de la membrane exosomale est homogène ce qui n'est pas le cas de la membrane plasmique où ce phospholipide se concentre dans le feuillet interne. Ceci révèle une translocation transmembranaire (*flip-flop*) élevée des lipides dans les exosomes (Laulagnier et al., 2004b). De plus, les exosomes d'oligodendrocytes contiennent des céramides qui participeraient à leur biogénèse (Trajkovic et al., 2008). De façon plus générale, la composition lipidique des exosomes se rapprocherait de celle des radeaux lipidiques comme le démontre la présence de gangliosides (GM1, GM3), de protéines comme la flotilline ou la stomatine comme cela a notamment été publié dans des réticulocytes (de Gassart et al., 2003).

Il est à noter qu'une étude datant de 2000 affirmait la présence de LBPA dans des exosomes sécrétés par la lignée RN de lymphocytes B (Denzer et al., 2000). Depuis, d'autres études ont affirmé le contraire (Laulagnier et al., 2004b; Mobius et al., 2003; Subra et al., 2007; Wubbolts et al., 2003). Or, ce lipide participerait à la biogénèse des vésicules intraluminales, de potentiels futurs exosomes (Matsuo et al., 2004; Stuffers et al., 2009). Il se pourrait que le LBPA participe à la courbure membranaire du MVE de part sa forme conique mais qu'il reste sur la membrane limitante, une fois la vésicule intraluminale « pincée » (Figure 13). Ceci expliquerait pourquoi dans la majorité des études, ce lipide ne se retrouve dans la membrane lipidique des exosomes.

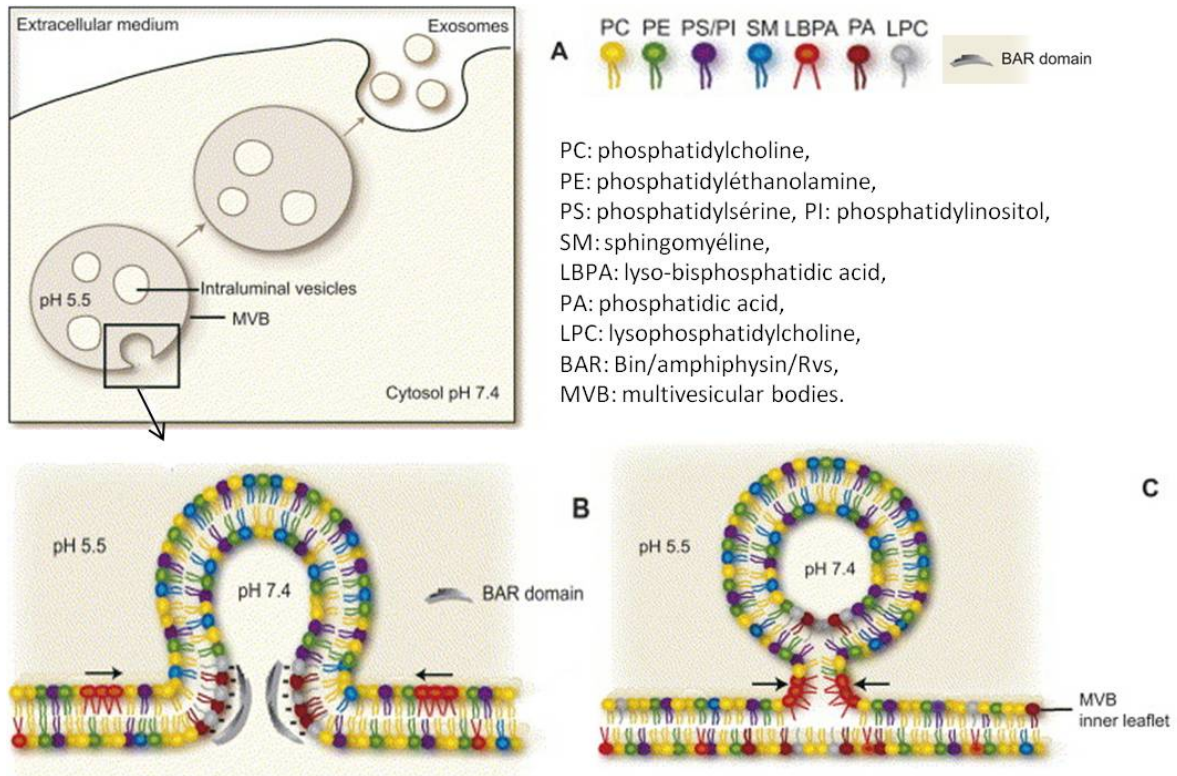


Figure 13 Modèle moléculaire de la biogénèse des ILV à l'intérieur des MVB impliquant les lipides présents à la membrane endosomale. A. Les ILV sont générées à partir de l'invagination de la membrane limitante de l'endosome. Il existe un gradient de pH entre la lumière de l'endosome (5,5) et le cytosol (7,5). B et C. La composition lipidique de la membrane bourgeonnante est basée sur des études lipidomiques d'exosomes de mastocytes de rat (RBL-2H3) et de cellules dendritiques humaines. L'initiation de la courbure serait réalisée par la formation d'un cluster de LBPA, qui se produit en présence d'un pH acide, au niveau de la couche interne de la membrane de l'endosome. Cette zone concentrerait certains lipides, comme la SM, en excluant le PC. Les lipides chargés négativement (PA et LPC) permettent grâce à leur domaine BAR de recruter des protéines qui rapprochent les deux morceaux de couche externe. La scission de la vésicule dans le lumen se produit lorsque les lipides des deux morceaux de couche externe sont suffisamment proches pour se mélanger, et par l'accumulation de LBPA au niveau du cou. (d'après (Subra et al., 2007)).

iii. Présence d'ARN

En 2007, Jan Lötvald et son équipe ont démontré que des exosomes sécrétés par des mastocytes murins et humains contenaient une quantité substantielle d'ARN messagers et de microARN. Les microARN (ou miR) sont de petits acides nucléiques non codants de 22 nucléotides environ. Il s'agit de régulateurs post-transcriptionnels, leur appariement à une séquence complémentaire de l'ARNm du gène cible conduisant à la répression transcriptionnelle ou à la dégradation de cet ARNm. Cette capacité de régulation fine en fait de puissants contrôleurs de l'expression génique. Grâce à des électrophorèses sur gel d'agarose, de la spectrophotométrie et l'utilisation du Bioanalyser Agilent, les auteurs ont pu détecter la présence d'ARN dans leurs exosomes isolés mais pas d'ADN (Figure 14). Dans ces expériences, les exosomes produits par des mastocytes de souris et d'humain comportaient 1272 ARNm et 121 miR mais pas d'ARNr. L'utilisation d'un système de traduction *in vitro* a permis de démontrer que l'ARNm présent dans les exosomes était fonctionnel, c'est-à-dire capable d'être traduit en polypeptides.

Les découvertes de Valadi *et al* ne s'arrêtent pas là, puisqu'ils définissent les exosomes transporteurs de matériel génétique comme un moyen de communication intercellulaire. En effet, les ARN dérivés des exosomes de mastocytes peuvent être transférés à d'autres mastocytes pour y être traduits. Ainsi, l'incubation de mastocytes humains en présence d'exosomes issus de mastocytes murins a induit la production de protéines de souris codées par les ARNm présents dans les exosomes. Ce transfert d'ARN serait spécifique du type cellulaire puisque les ARN contenus dans des exosomes de mastocytes ne sont pas repris par des cellules CD4⁺ murines (Valadi *et al.*, 2007).

Il s'agit là d'une découverte fascinante : les exosomes ont été repris par des cellules réceptrices qui ont alors été capables de traduire l'ARNm qu'ils transportaient. Les exosomes apparaissent dès lors comme des médiateurs incontournables de la communication intercellulaire.

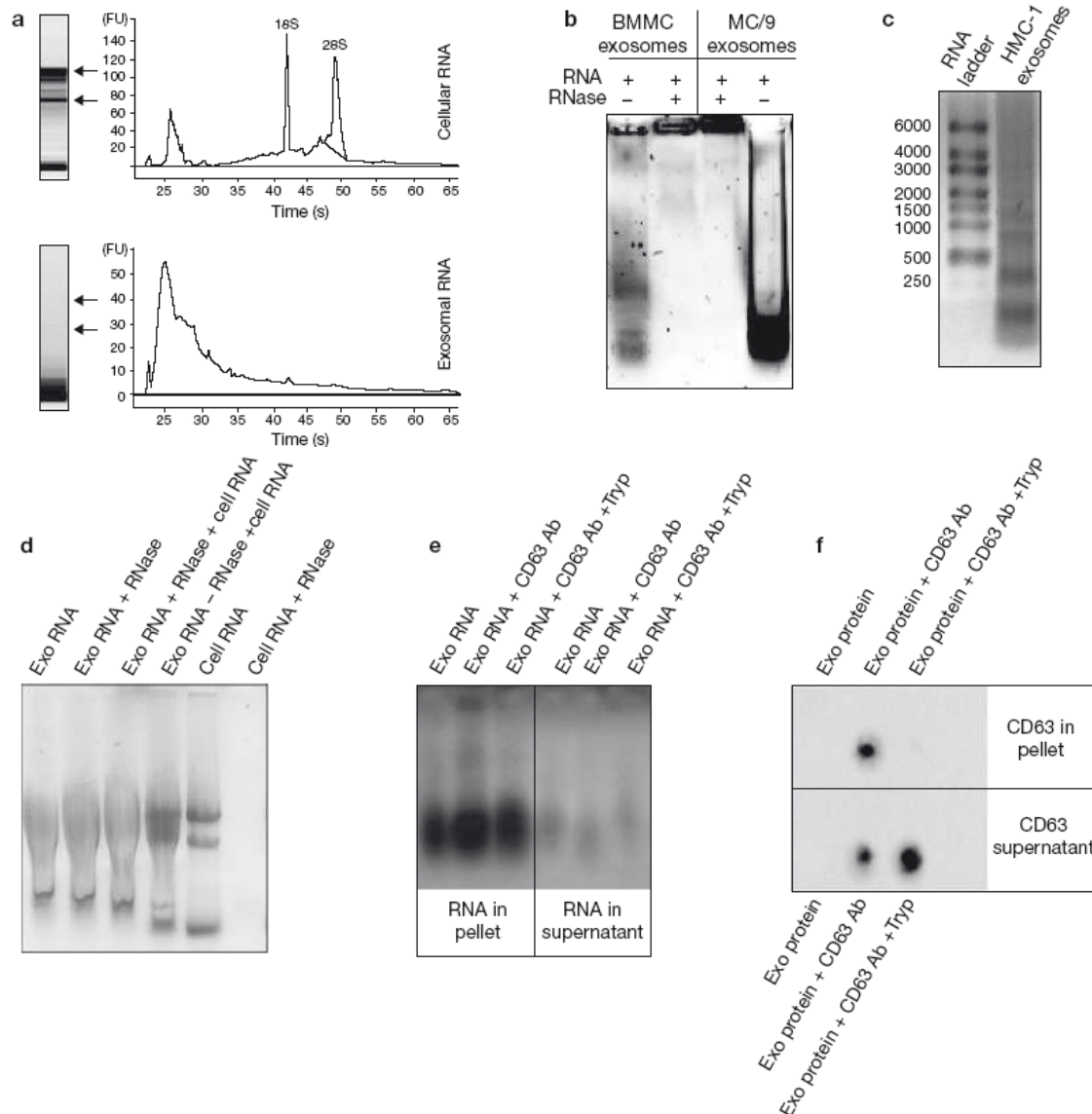


Figure 14 Les exosomes de mastocytes contiennent des ARN. a) l'ARN des exosomes dérivés des cellules MC/9 (lignée cellulaire de mastocytes de souris) et celui de ces cellules ont été détectés grâce au Bioanalyser. b) la présence d'ARNm polyadénylé dans les exosomes MC/9 et BMMC (mastocytes de souris dérivés de la moelle osseuse) a été déterminée par la conversion de l'ARNm en ADNc en utilisant une queue poly-T et une transcriptase inverse en présence de CTP radioactif. Contrôle négatif : les échantillons sont traités à la RNase avant d'initier la synthèse d'ADNc. c) détection de l'ARN exosomal HM1-C (cellules issues d'une lignée cellulaire humaine de mastocytes) sur un gel d'agarose 1% marqué avec du bromure d'éthidium. d) la comparaison des exosomes MC/9 intacts (exo) et ceux traités avec de la RNase ne montre aucune différence dans la dégradation de l'ARN. L'ARN cellulaire ajouté aux exosomes est dégradé par le traitement à la RNase. e) et f) les exosomes MC/9 traités avec de la trypsine (tryp) ne semblent pas différents en ce qui concerne leur contenu en ARN en comparaison avec le contrôle, indiquant qu'il n'y a pas de macromolécules contenant des ARN attachées aux exosomes (Ab= Antibody/anticorps) alors que les anticorps anti-CD63 ajoutés aux exosomes se détachent après un traitement à la trypsine (Valadi et al., 2007).

L'année suivante, Skog *et al* démontrent que des cellules de glioblastome en culture sécrètent des exosomes contenant des ARNm, qui sont repris par des cellules vasculaires endothéliales. Les cellules endothéliales expriment ensuite les protéines codées par ces ARNm. Or, l'addition des exosomes du glioblastome sur les cellules endothéliales provoque une augmentation de la prolifération de ces cellules. Un des ARNm particulièrement enrichi dans les exosomes du glioblastome code pour l'EGF-R, impliqué dans la prolifération des cellules endothéliales. Le glioblastome pourrait ainsi par la voie exosomale, favoriser la néo-angiogénèse à partir des vaisseaux qui l'entourent (Skog *et al.*, 2008).

En 2010, Nobuyoshi Kosaka et ses collaborateurs ont montré que des cellules HEK293 (épithélium rénal humain) et des COS-7 (fibroblastes de singe) sécrétaient des microARN via les exosomes et que cette sécrétion pouvait être modulée par l'utilisation de GW4869 un inhibiteur chimique de la nSmase2 (utilisée par Trajkovik *et al* en 2008 lors de leur démonstration du rôle des céramides dans la biogénèse des exosomes) et par la surexpression ou l'extinction de la nSmase2. Dans leur modèle, la sécrétion de miR exosomaux est céramide-dépendante et ESCRT-indépendante. La partie la plus fascinante de leur publication est la possibilité de transfert de petits ARN artificiels ou naturels via les exosomes : des siARN (*silencing*) et des miR sont empaquetés dans les exosomes, sécrétés et repris par des cellules receveuses dans lesquelles ils sont fonctionnels (Figure 16). Leur démonstration s'achève avec l'incubation d'exosomes contenant le miR146a, un suppresseur de tumeur, sur des cellules PC-3M (lignée cancéreuse métastatique de la prostate) ce qui induit une diminution de leur prolifération. De plus, cet effet biologique est réduit lorsque les cellules sécrétrices d'exosomes sont traitées au GW4869. Cette étude démontre que le transfert de miR exosomaux a un impact biologique sur les cellules receveuses (Kosaka *et al.*, 2010). Un an plus tard est publiée dans *Nature Biotechnology* un article portant sur l'injection d'exosomes dans le cerveau d'une souris permettant la délivrance *in situ* de siARN fonctionnels. Les chercheurs ont notamment travaillé sur des exosomes chargés avec des siRNA dirigés contre la protéase BACE1. BACE1 clive en N-terminal l'APP (*amyloid precursor protein*) ce qui produit le peptide β -amyloïde qui s'accumule sous forme d'agrégats dans la maladie d'Alzheimer. L'injection de ces exosomes anti-BACE1 dans un cerveau de souris sauvage a provoqué une extinction drastique de la protéine (62%) et de son ARNm (60%), laissant entrevoir la possibilité de leur utilisation à des fins thérapeutiques (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011).

La communauté scientifique actuelle place de nombreux espoirs dans les ARN véhiculés par les exosomes pour le diagnostic, le pronostic et le traitement de certaines pathologies (cancers, maladies neurodégénératives...). A travers le monde, de nombreuses équipes se sont penchées sur les ARN contenus dans des exosomes et/ou des microvésicules sécrétés par les cellules tumorales et s'intéressent à ces ARN circulants en tant que possibles biomarqueurs (Gallo *et al.*, 2012). C'est le cas, par exemple, d'exosomes purifiés à partir de salive humaine ou de sang (Michael *et al.*, 2009;

Palanisamy et al., 2010; Rabinowits et al., 2009). La comparaison du contenu en ARN des exosomes et de leurs cellules d'origine a montré un enrichissement spécifique en tel ou tel ARN démontrant une sélection des ARN sécrétés. Ainsi la famille des microARN Let-7 est sélectivement sécrétée par la voie des exosomes dans une lignée de cellules cancéreuses métastatiques gastriques (Ohshima et al., 2010). A l'heure actuelle, les mécanismes de tri et d'adressage des ARN dans les exosomes sont méconnus. Il est probable que le complexe de protéines ESCRT soit un médiateur de ce processus, puisque ESCRT II peut directement se lier à l'ARN (Irion and St Johnston, 2007) et le blocage de la formation du MVB par la déplétion des ESCRT détériore l'action régulatrice des miR (Gibbings et al., 2009; Lee et al., 2009).

La plupart des analyses réalisées sur les exosomes ont démontré la présence d'ARNm et de miR, très probablement en raison de la disponibilité et de la facilité des techniques d'hybridation pour détecter ces ARN. Or, de nouvelles méthodes d'analyse ont vu le jour et permettent la détection d'autres types d'ARN non codants, on parle de NGS pour *Next-Generation Sequencing*. Ainsi, par des techniques de NGS, Nolte-'t Hoen *et al* ont démontré que les exosomes de cellules dendritiques contenaient, en plus des miR et des ARNm, d'autres ARN tels que des ARN de transfert (ARNt) mais aussi de petits ARN non codants tels que des ARN-vault (Nolte-'t Hoen et al., 2012). Dans les cellules eucaryotes, les vaults sont de larges particules ribonucléoprotéiques regroupant des protéines et des ARN-vault (Figure 15). Le terme *vault* fait référence à la forme de ce complexe (trois fois plus gros qu'un ribosome) semblable à un tonneau présentant de multiples arches qui rappellent les plafonds voûtés (*vaulted*) des cathédrales (van Zon et al., 2003).

La recherche sur les ARN exosomaux et leur pouvoir de régulation génique n'en est qu'à ses balbutiements.

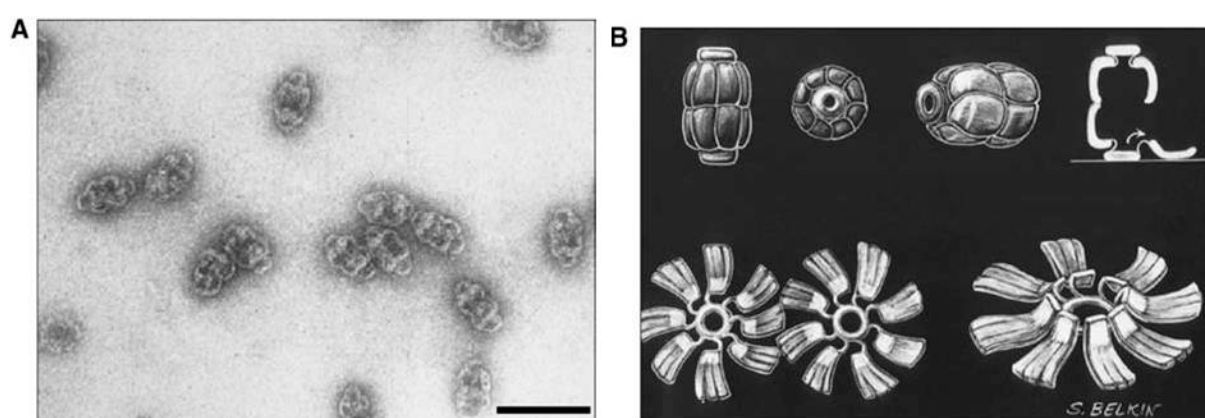


Figure 15 Observation de particules vault. A. Micrographie électronique de particules vault purifiées à partir de foie de rat et contrasté négativement avec de l'acétate d'uranyl (Bar : 100 nm). B. Proposition de modèle schématique du complexe vault datant de 1991 (d'après (van Zon et al., 2003)).

4. Fonctions des exosomes

Il a été démontré, *in vivo* et *in vitro*, que la libération d'exosomes par les globules rouges était un procédé d'élimination, durant la différenciation des réticulocytes en érythrocytes, de protéines de la membrane plasmique, diminuant ainsi en taille et perdant certaines activités spécifiques membranaires (Johnstone, 2006; Vidal et al., 1997). Les exosomes représenteraient pour ces cellules dépourvues de lysosomes un moyen aisé de se débarrasser de protéines devenues indésirables. Depuis leur découverte dans les années 80, il a été montré que de nombreux types cellulaires étaient capables de sécréter des exosomes. Les différentes études produites ont permis de montrer que les exosomes n'étaient pas seulement un moyen d'élimination de protéines obsolètes mais qu'ils pouvaient également jouer un rôle clé dans la communication intercellulaire et la propagation de divers messages à travers l'organisme, par le transfert de protéines et d'ARN.

i. Dans le système immunitaire

Le système immunitaire est constitué de deux barrières : l'immunité innée, représentée par des cellules capables de phagocyter la plupart des pathogènes qui entrent dans l'organisme (macrophages, cellules dendritiques), et l'immunité spécifique, due aux lymphocytes B et T. L'activation des lymphocytes T est restreinte par la présentation des antigènes (Ag) en association avec des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I et II. Le déclenchement de la réponse immunitaire spécifique se fait au niveau des cellules présentatrices d'antigène (CPA), comme les lymphocytes B et les cellules dendritiques, qui sont capables d'apprêter les antigènes et de les présenter à leur surface en association avec du CMH I ou II pour activer les lymphocytes T. Les LT sont de deux types : les $CD4^+$, ou LT *helper*, sont activés par des complexes Ag-CMH II, et vont sécréter des cytokines pour orchestrer la réponse immunitaire spécifiquement contre l'antigène. Les LT $CD8^+$, ou LT cytotoxiques, sont activés par les Ag présentés sur des CMH I, et vont ensuite induire la destruction des cellules infectées par exemple par un virus.

La première étude sur les exosomes sécrétés par des cellules immunitaires a été réalisée en 1996 par Graça Raposo *et al.* L'équipe observe qu'une lignée de lymphocytes B en culture sécrète des exosomes, qui contiennent des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII). Les exosomes sécrétés par cette lignée de lymphocytes B incubée avec des antigènes provenant de mycobactéries sont capables à eux seuls d'activer la prolifération de lymphocytes T $CD4^+$ en culture, tandis que des exosomes sécrétés par des cellules B naïves n'induisent pas cette prolifération. Ces résultats précurseurs ont montré que les exosomes étaient porteurs de messages qu'ils pouvaient transmettre entre les cellules (Raposo et al., 1996).

Les années suivantes, le groupe de Salaheddine Mécheri s'est intéressé aux exosomes de mastocytes, cellules à granules du système immunitaire inné, en particulier impliquées dans les phénomènes allergiques. Ces cellules sécrètent des exosomes qui contiennent des molécules de classe II (CMHII), les protéines chaperonnes Hsp60 et 70, des facteurs de co-stimulation (CD86), et les protéines d'adhésion cellulaire LFA-1 (*leucocyte function-associated molecule 1*) et I-CAM (*intercellular adhesion molecule*) (Skokos et al., 2001). Lorsque les mastocytes sont incubés *in vitro* avec un antigène, cet antigène est ensuite sécrété par les exosomes, en association avec les chaperonnes Hsp60 et Hsp70. *In vivo*, l'administration à des souris naïves d'exosomes de mastocytes préincubés avec un antigène provoque une maturation des cellules dendritiques, qui augmentent leur production de CMH II et de facteurs de co-stimulation. Les cellules dendritiques sont ensuite capables d'activer des lymphocytes en leur présentant les peptides qui ont été apportés par les exosomes (Skokos et al., 2003). Cette implication des mastocytes dans la mise en route de l'immunité spécifique n'avait encore jamais été décrite. De plus, cette étude montre que les exosomes peuvent transférer des protéines à des cellules qui sont capables de les utiliser pour déclencher une réponse immunitaire.

En 2012 a été publiée une étude sur les exosomes de cellules NK (*Natural Killers*) menée par Luana Lugini et ses collaborateurs. Ils y démontrent notamment que les exosomes sécrétés par ces cellules contiennent des protéines cytotoxiques qui leur sont propres telles que la perforine. Ces exosomes sont biologiquement actifs puisqu'ils présentent une activité cytolytique lorsqu'ils sont incubés avec des cellules tumorales de différentes lignées (Lugini et al., 2012).

Une grande partie des études sur les exosomes sécrétés par les cellules du système immunitaire porte sur les cellules dendritiques (DC), qui ont un rôle central dans le déclenchement de la réponse immunitaire. A l'état immature, elles interviennent dans l'immunité innée, en phagocytant les pathogènes et en les éliminant. Lorsqu'elles sont activées, elles présentent les complexes antigènes-CMH aux lymphocytes T pour permettre le déclenchement de la réponse spécifique. En 1998, une étude a montré pour la première fois que ces cellules sécrétaient des exosomes. Des cellules dendritiques immatures en culture, incubées avec un antigène, l'endocytent, et sécrètent des exosomes qui portent des molécules du CMH I et II fonctionnelles associées à l'antigène, ainsi que des facteurs de co-stimulation (CD80 et CD86) nécessaires à l'activation de la réponse immunitaire (Zitvogel et al., 1998).

En 2002, Théry *et al* ont montré que des cellules dendritiques n'exprimant pas de CMH II étaient néanmoins capables d'activer des lymphocytes T CD4⁺ si elles avaient été pré-incubées avec des exosomes sécrétés par des cellules dendritiques normales. Les exosomes leur ont donc apporté les

complexes CMH II – peptides qui leur manquaient pour activer les lymphocytes. Ces résultats montrent que les exosomes permettent le transfert de protéines fonctionnellement actives, à distance, entre diverses cellules du système immunitaire, et qu'ils sont ainsi capables de participer au déclenchement d'une réponse immune (Thery et al., 2002).

Ce transfert de protéines entre cellules dendritiques via les exosomes est d'une importance capitale en particulier dans l'immunité anti-tumorale. En effet, les tumeurs sont capables de développer des systèmes de défense et de camouflage dans l'organisme, qui rendent souvent impossible le déclenchement d'une réponse anti-tumorale efficace. Or l'équipe de Laurence Zitvogel, à Paris, a eu l'idée d'utiliser le potentiel immuno-déclencheur des exosomes de cellules dendritiques pour lutter contre les tumeurs. *In vitro*, des DC prélevées chez une souris porteuse d'une tumeur sont incubées avec des peptides issus de cette tumeur. Les exosomes sécrétés par ces cellules dendritiques sont ensuite ré-injectés en sous-cutané à la souris. Les chercheurs observent après 60 jours une activation des lymphocytes T CD8⁺ spécifiquement dirigée contre la tumeur, et une suppression de la progression tumorale, voire le rejet de la tumeur. De plus, les animaux gardent une mémoire de cette immunité spécifique, qui leur permet d'être protégés à long terme contre la tumeur (Zitvogel et al., 1998).

De nombreuses études ont porté sur la fonction physiologique des exosomes sécrétés par des cellules dendritiques (Dex) dans des dispositifs *in vitro* et *in vivo*. Les Dex ayant été impliqués dans la stimulation de l'immunité antitumorale, la perspective de vaccins exosomaux anti-tumoraux autologues chez l'humain a vu le jour. Cela a conduit à des essais cliniques de phase I (validation de la faisabilité, évaluation des doses à administrer et des effets indésirables à court terme) chez des patients atteints d'un cancer du poumon à grandes cellules (Morse et al., 2005) et chez des patients ayant un mélanome métastatique (Escudier et al., 2005). Dans cet essai, mené par l'institut Gustave Roussy en collaboration avec l'institut Curie, les patients ont reçu des injections de Dex recouverts de l'antigène de mélanome MAGE3. Ainsi, les chercheurs ont pu démontrer la faisabilité du traitement et sa non toxicité. Par contre, les résultats concernant son efficacité se sont avérés peu concluants puisque n'ont été observés que chez quelques patients une régression de la tumeur cutanée et la disparition des métastases. La faible capacité immunogénique de ces Dex a conduit les chercheurs à développer une seconde génération de Dex dont les propriétés immunostimulatoires ont été améliorées par le traitement préalable des cellules dendritiques sécrétrices à l'interféron-g. Cette seconde génération est appelée g-Dex et est actuellement l'objet d'essais cliniques de phase II (Viaud et al., 2011).

Pendant longtemps, les chercheurs se sont intéressés au contenu en protéines que pouvaient s'échanger les cellules immunitaires. Depuis 2007 et les travaux de *Valadi et al* il est désormais connu que les exosomes contiennent également des acides nucléiques (*Valadi et al., 2007*). Ainsi, en 2011, deux publications font état de transfert de microARN entre des cellules du système immunitaire. Maria Mittelbrunn et ses collaborateurs ont démontré le transfert de miR via les exosomes entre des lymphocytes T et des cellules présentatrices d'antigènes tandis que le groupe d'Adrian E. Morelli a étudié le transfert de miR entre cellules dendritiques (*Mittelbrunn et al., 2011; Montecalvo et al., 2011*). L'échange de matériel génétique via les exosomes ajoute une nouvelle dimension à la communication intercellulaire au sein du système immunitaire (*Figure 16*).

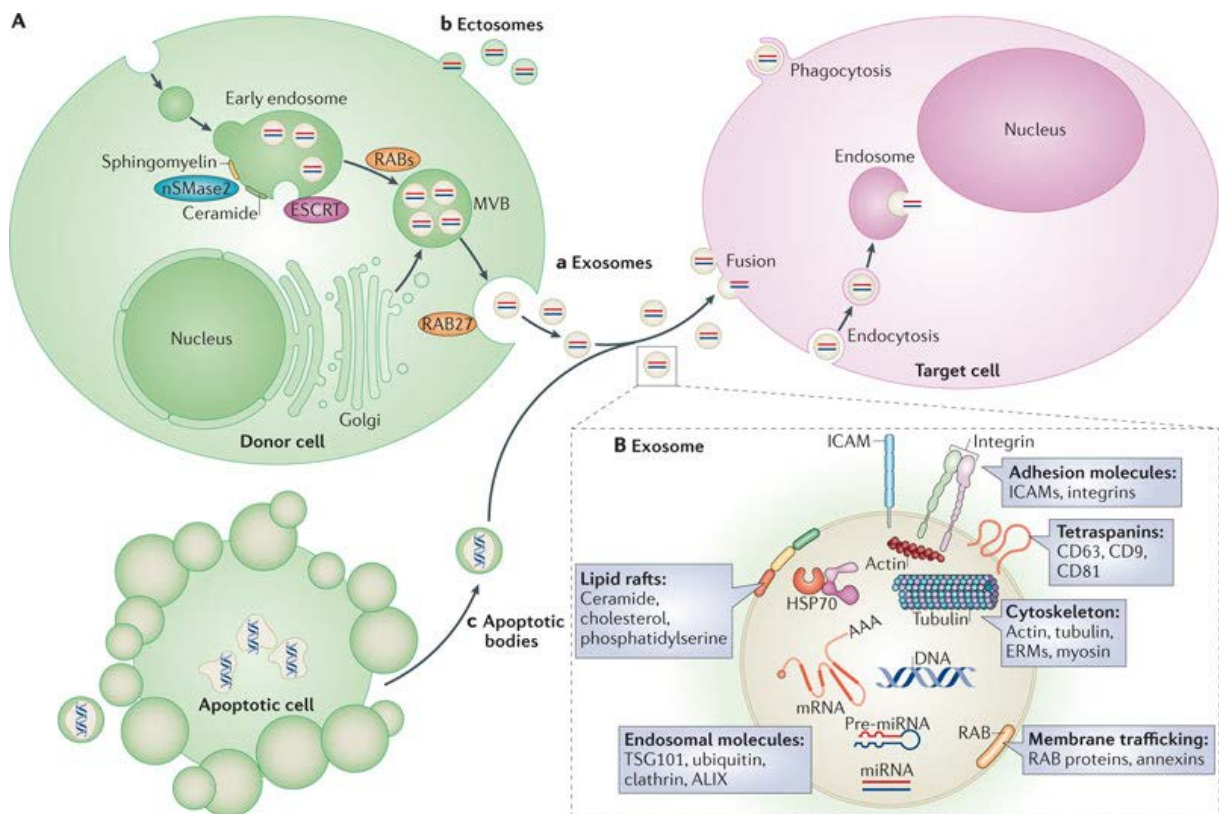


Figure 16 Un nouveau mode de communication intercellulaire : le transfert d'ARN par les microvésicules parmi lesquelles, les exosomes. A. Les vésicules extracellulaires tirent leur origine d'au moins trois mécanismes différents : a) invagination de la membrane d'un endosome multivésiculé (ou corps multivésiculaire, MVB) et fusion de ce dernier avec la membrane plasmique ; b) vésiculation de la membrane plasmique donnant naissance à des microvésicules variées dont les ectosomes ; c) libération de corps apoptotiques par une cellule en apoptose. Ces trois types de vésicules peuvent contenir du matériel génétique et le délivrer à une cellule receveuse. B. Les mécanismes d'interaction des exosomes avec la cellule cible sont encore à l'étude mais les exosomes seraient en mesure i) de fusionner avec la membrane de la cellule receveuse, ii) d'être endocyté ou phagocyté (iii) puis de subir un mécanisme de *back fusion* afin de délivrer son contenu luminal dans le cytosol de la cellule (d'après (*Mittelbrunn and Sanchez-Madrid, 2012*)).

ii. Exosomes tumoraux

L'existence d'exosomes tumoraux ou Tex (*Tumor-derived exosomes*) a été démontrée par l'analyse de surnageants de culture de lignées tumorales et la détection de leur présence dans des ascites de patients cancéreux. Les Tex contiennent entre autres des molécules du CMH I, la protéine chaperonne Hsp70, Tsg101, CD9. Mais ils contiennent également des protéines spécifiques de la tumeur et notamment des antigènes tels que Mart-1, un antigène de mélanome (Andre et al., 2002b; Taylor and Gercel-Taylor, 2005; Wolfers et al., 2001). Joseph Wolfers et ses collaborateurs ont montré que les Tex transfèrent des antigènes aux cellules dendritiques et activent ainsi l'immunité anti-tumorale en modulant les effets anti-tumeur des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. De même, André et al ont montré que des exosomes de patients atteints d'un mélanome délivrent Mart-1 aux cellules dendritiques qui le présentent alors aux lymphocytes T. Le groupe de Gabriele Multhoff a lui montré que des Tex présentant à leur surface la chaperonne Hsp70 stimulent la migration et l'activité cytolytique des cellules NK (Gastpar et al., 2005). Les premières études sur les Tex ont amené les scientifiques à les considérer comme une source d'antigènes de réjection des tumeurs et à envisager leur utilisation thérapeutique (Andre et al., 2004; Andre et al., 2002a). A ce jour, aucun essai clinique n'a employé de Tex, probablement à cause de leur nature versatile. En effet, bien que leur effet activateur de la réponse immunitaire ait été prouvé, les Tex sont également capables de l'inhiber.

En étudiant les effets des Tex sur la croissance tumorale, Liu et al ont démontré que l'injection d'exosomes sécrétés par deux lignées cancéreuses TS/A et 4T1 (carcinomes mammaires) à des souris (BALB/c ou *nude*) stimule la croissance de la tumeur implantée et entraîne le développement rapide de nécroses et de métastases. L'effet drastique observé chez les souris *nude* (qui sont dépourvues de défense liée aux lymphocytes T mais chez qui la réponse immunitaire liée aux cellules NK est toujours active) les ont conduits à s'intéresser à l'effet des Tex sur l'activité cytotoxique des cellules NK. Dans leur étude, le traitement de souris BALB/c aux exosomes TS/A entraîne une réduction du pourcentage de cellules NK dans la rate et les poumons. Et dans leurs mains, les Tex inhibent l'activité cytotoxique des cellules NK *ex vivo* et *in vitro* et influent notamment sur la sécrétion de perforine (Liu et al., 2006). En outre, les exosomes sécrétés par certaines tumeurs (LNCaP -lignée cancéreuse de la prostate- et ascites de cancers ovariens) présentent à leur surface le Fas ligand ou FasL. Son interaction avec le récepteur Fas porté par les lymphocytes T déclenche leur apoptose, participant ainsi à l'évasion immunitaire de la tumeur (Abusamra et al., 2005; Taylor and Gercel-Taylor, 2005). Enfin, les Tex contiennent des molécules antiprolifératives, comme le TGFβ (*tumour growth factor β*) et pourraient inhiber la réponse anti-tumorale de l'organisme en réduisant la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ induite par l'interleukine IL-2 (Clayton et al., 2007).

Il apparaît donc que les exosomes sécrétés par les cellules tumorales peuvent participer à la progression tumorale en favorisant son évasion immunitaire. Les Tex peuvent également favoriser la prolifération des cellules tumorales. Dans une étude de 2009, des cellules d'une tumeur gastrique humaine ont été mises en culture, puis les exosomes sécrétés par ces cellules ont été incubés sur d'autres cellules qui provenaient soit de la même tumeur, soit d'une tumeur gastrique d'un autre individu. Il a été constaté une augmentation significative de la croissance cellulaire dans les deux cas. Cette activité proliférative pourrait être due à une stimulation des voies PI3K/Akt (*phosphoinositide 3-kinase*) et MAPK/ERK (*Mitogene activated protein kinase/extracellular regulated protein kinase*) dans les cellules receveuses car l'incubation des cellules avec les Tex provoque une augmentation de la phosphorylation de Akt et de ERK1/2 (Qu et al., 2009). Récemment, Fabbri et al se sont intéressés au contenu en microARN d'exosomes isolés à partir de surnageants de culture de lignées cancéreuses A-549 et SK-MES (cancer du poumon). Leurs travaux tendent à prouver que des miR transportés par des Tex sont capables de moduler la croissance tumorale en activant la voie NFκB et la sécrétion de cytokines inflammatoires prométastatiques par fixation sur les récepteurs de type Toll (TLR, *Toll Like Receptor*) portés par les cellules immunitaires alentours (Fabbri et al., 2012).

Enfin, la libération d'exosomes et la sécrétion de molécules solubles modifieraient ensemble l'environnement autour de la tumeur. Bobrie et ses collaborateurs ont mis en lumière la fonction pro-tumorale de la GTPase Rab27a qui module la sécrétion d'exosomes et de molécules solubles qui participeraient à limiter la réponse immunitaire (Bobrie et al., 2012). De plus, l'hypoxie qui caractérise l'environnement tumoral favorise la sécrétion d'exosomes et de protéines solubles qui stimuleraient l'angiogénèse et l'invasion tumorale sous forme métastatique (Park et al., 2010). Les Tex semblent donc jouer un rôle important dans la modulation du microenvironnement particulier des tumeurs.

5. Recapture des exosomes

De plus en plus d'études tendent à prouver que les exosomes sont un moyen de communication intercellulaire. Cela implique qu'une fois sécrétés, les exosomes interagissent avec une (des) cellule(s) receveuse(s) modifiant ainsi sa (leur) physiologie. Néanmoins, les mécanismes qui régissent cette interaction sont largement méconnus, notamment pour des raisons techniques, la petite taille des exosomes et la probable rapidité des événements les rendant difficilement observables en microscopie optique. Cependant, il est possible de recenser quelques publications ayant tenté de lever le voile sur la réception des exosomes.

Parmi les protéines exprimées par la majorité des exosomes sécrétés se trouvent les molécules d'adhésion cellulaire et notamment la famille des intégrines. On est en droit de penser que ces

molécules jouent un rôle dans la fixation des exosomes à leur cible. En 2004, les travaux d'Aled Clayton *et al* ont montré que les exosomes de lymphocytes B portaient les intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$ et que ces dernières étaient impliquées dans la fixation de ces exosomes à la fibronectine, au collagène et aux fibroblastes activés au (TNF)- α . De plus, la fixation des exosomes à des fibroblastes activés au (TNF)- α déclenche des variations du calcium cytosolique sous la dépendance des intégrines (Clayton *et al.*, 2004). Il est vraisemblable de penser que le ciblage spécifique des exosomes à un ensemble déterminé de cellules receveuses fait intervenir des ligands spécifiques et des molécules d'adhésion. Cela a notamment été démontré dans la communication exosomale entre le système immunitaire et l'épithélium intestinal. Les exosomes sécrétés par ce dernier se fixent préférentiellement aux cellules dendritiques immatures plutôt qu'aux lymphocytes B et T (Mallegol *et al.*, 2007). En 2007, Elodie Segura et ses collaborateurs se sont intéressés au mode d'interaction des exosomes avec les cellules dendritiques. Des DC préalablement fixées au paraformaldéhyde (afin de prévenir tout mouvement membranaire) ne sont alors pas capables d'activer les lymphocytes T lorsqu'on leur fournit un antigène. En revanche, si on les incube avec des exosomes porteurs de complexes CMH-antigène, elles deviennent en mesure d'activer les lymphocytes. Ces résultats montrent que les exosomes sont capables de participer à l'activation des lymphocytes T par les DC sans la nécessité d'une endocytose. D'ailleurs, la fixation des exosomes sur les DC passerait par une interaction entre ICAM-1 (abondamment présent sur les exosomes de cellules dendritiques) et son récepteur LFA-1 sur les DC (Segura *et al.*, 2007).

Les exosomes peuvent donc interagir en surface avec des récepteurs présents à la membrane de la cellule. Cette interaction de surface peut déclencher la transduction du signal à même d'activer la cellule réceptrice. Les exosomes fixés à la surface de la cellule receveuse peuvent également participer à l'activation d'une autre cellule en apportant une partie des protéines nécessaires à cette activation. En revanche, le transfert de protéines cytosoliques ou d'ARN actifs dans le cytosol de la cellule réceptrice implique une fusion de l'exosome avec cette dernière. Cette étape de fusion pourrait avoir lieu soit directement à la membrane plasmique soit avec la membrane limitante de l'endosome après son endocytose, on parle alors de *back fusion*. Enfin, il est également envisageable que les exosomes soient internalisés par phagocytose (Figure 17).

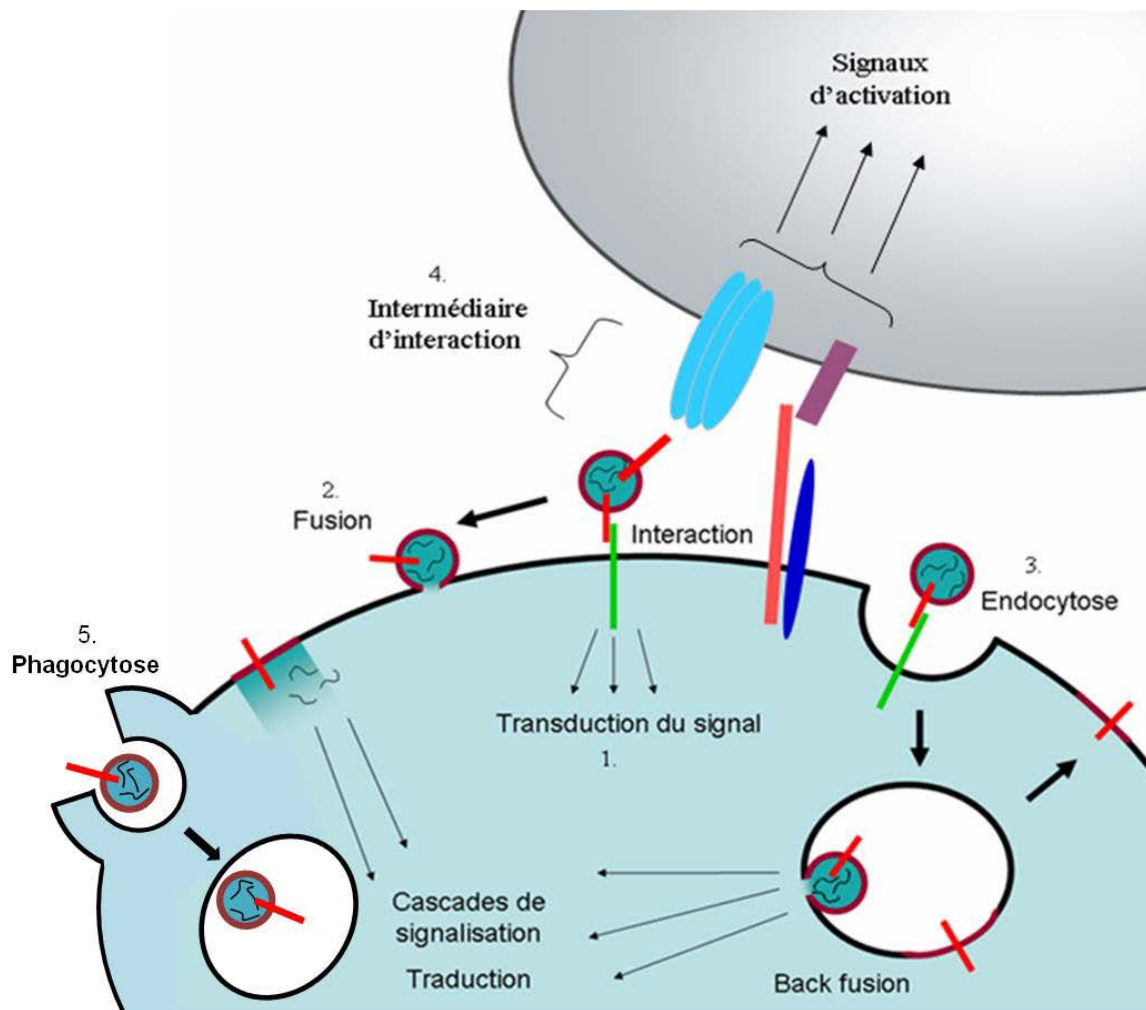


Figure 17 Les différents modes d'interaction des exosomes avec leur cellule cible. Un exosome peut interagir avec des récepteurs transmembranaires présents à la surface de la cellule réceptrice. Il peut ensuite se produire une transduction du signal directement par activation en surface de récepteurs (1). L'exosome peut également fusionner (ou hémifusionner) directement avec la membrane plasmique, ses protéines se retrouvant ancrées à la membrane de la cellule réceptrice, et son contenu libéré dans le cytosol (2). L'exosome peut également être endocyté, puis fusionner avec la membrane limitante de l'endosome. Son contenu est alors également libéré dans le cytosol, et ses protéines membranaires peuvent se retrouver ré-exprimées en surface après fusion de l'endosome avec la membrane plasmique (3). En outre, les exosomes peuvent servir de partenaire à la cellule réceptrice pour activer une autre cellule, en apportant une partie des protéines nécessaires à cette activation (4). Enfin, l'exosome peut être phagocyté et pourrait, comme avec la membrane de l'endosome, fusionner avec la membrane du phagosome pour libérer son contenu luminal dans le cytosol (5).

L'hypothèse d'une possible *back fusion* de l'exosome internalisé (par endocytose ou phagocytose) trouve des arguments favorables dans l'étude des vésicules intraluminales et des virus. En effet, Falguières *et al* ont démontré que les ILV étaient capables de refusionner avec la membrane limitante des MVE dont elles sont issues (Falguières *et al.*, 2009). De plus, certains rétrovirus sont endocytés puis sont capables de fusionner avec la membrane de l'endosome, libérant ainsi leur ADN dans le cytoplasme de la cellule. Ce mécanisme de *back fusion* virale est contrôlé par des protéines qui sont également impliquées dans la formation des vésicules intraluminales (Le Blanc *et al.*, 2005; Luyet *et al.*, 2008). On peut donc imaginer une *back fusion* exosomale qui impliquerait les mêmes acteurs protéiques. Un tel processus pourrait non seulement permettre le déversement du contenu exosomal dans le cytosol de la cellule mais pourrait aussi conduire à l'entrée de protéines membranaires exosomales dans la membrane endosomale et leur possible réexpression à la membrane plasmique (récepteurs de surface, etc).

Une étude réalisée en 2004 a montré que les exosomes sécrétés par les cellules dendritiques en culture peuvent être endocytés par d'autres cellules dendritiques. Des exosomes de DC marqués avec le colorant lipidique fluorescent PKH67, sont incubés sur des cellules dendritiques et leur internalisation est suivie en microscopies confocale et électronique. Ils sont d'abord localisés au niveau des compartiments endosomaux précoces (colocalisation avec la transferrine) puis ils passent dans les compartiments plus tardifs (colocalisation avec Lamp1 après 20 minutes). *In vivo*, des exosomes fluorescents injectés à une souris se retrouvent 2h après dans les endosomes des macrophages du sang circulant, puis dans les cellules dendritiques spléniques 24 à 48h plus tard. Ces cellules dendritiques expriment ensuite à leur surface les antigènes apportés par les exosomes et les présentent aux lymphocytes T CD8⁺ en association avec les molécules du CMH synthétisés dans la cellule dendritique. Il y a donc un apprêtement des antigènes exosomaux dans les endosomes de la cellule réceptrice avant leur exposition en surface (Morelli *et al.*, 2004). La réexpression à la surface cellulaire de protéines apportées par les exosomes implique une fusion des exosomes endocytés avec la membrane limitante de l'endosome, puis une fusion des compartiments endosomaux avec la membrane plasmique. Cette étude semble donc suggérer l'existence du mécanisme de *back fusion*. En 2008, cette même équipe publie des images convaincantes de microscopie électronique représentant des exosomes marqués aux billes d'or incubés sur des cellules dendritiques et qui se retrouvent à la surface des cellules et dans des compartiments endocytaires (Figure 18 d'après (Montecalvo *et al.*, 2008)).

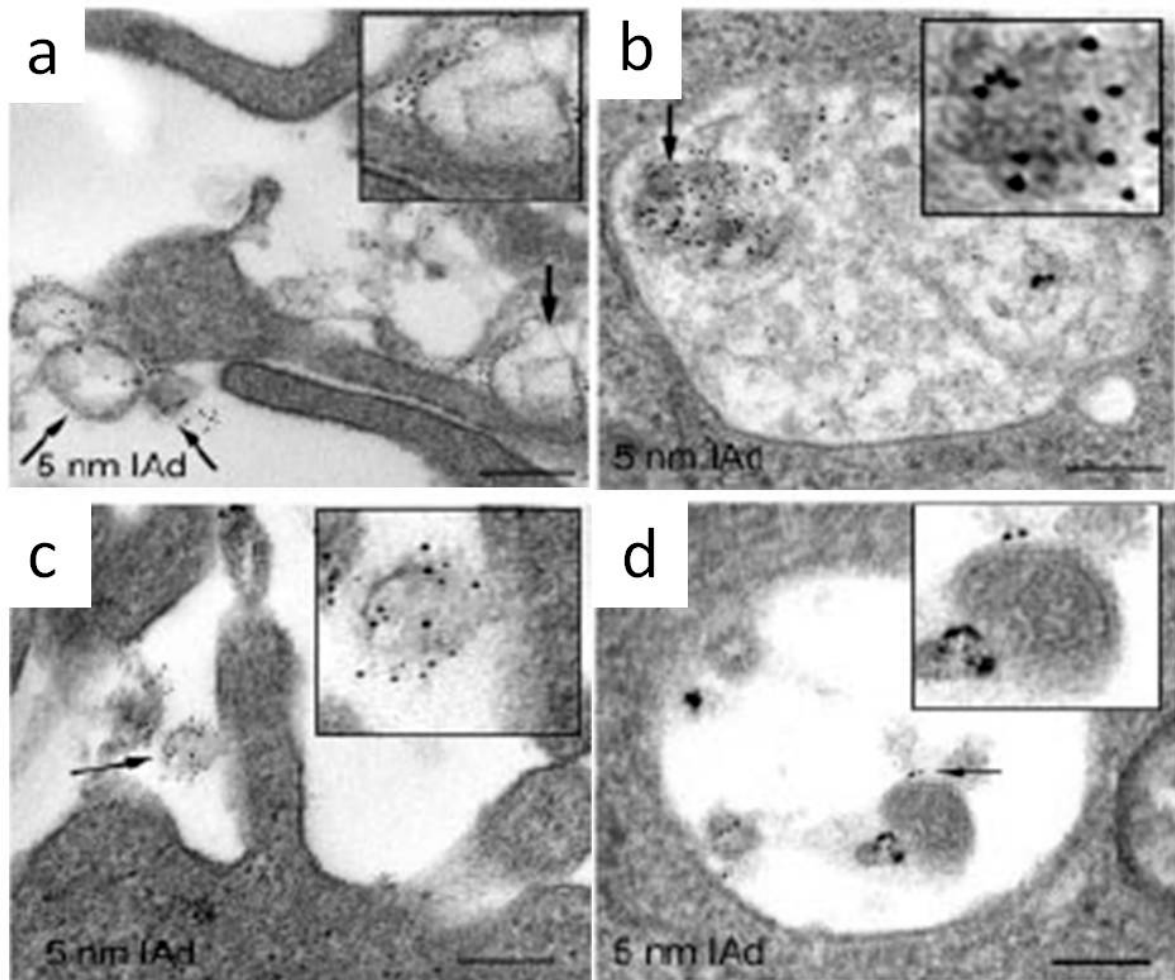


Figure 18 Observation en microscopie électronique de l'interaction entre les exosomes et des cellules dendritiques. Des exosomes isolés à partir de surnageants de cellules dendritiques issues de la moelle osseuse (BMDC) de souris sont marqués avec un anticorps dirigé contre IAd (CMH II) conjugué à des billes d'or de 5 nm puis incubés sur des BMDC immatures et matures (IAB). Trente minutes plus tard, les exosomes marqués aux billes d'or sont détectés fixés à la surface cellulaire ou à l'intérieur de vésicules endocytaires dans des BMDC immatures (a et b) et matures (c et d). Les encarts sont des grossissements des exosomes indiqués par une flèche. Bar : 100 nm. (Montecalvo et al., 2008).

En 2009, l'équipe de Stefano Fais s'est intéressée à la sécrétion et à la réception des exosomes de mélanomes au sein du microenvironnement particulier de ces cellules tumorales qui survivent dans un environnement acide, une condition qui ne permet pas la survie des cellules saines. Ils ont montré que l'acidité augmentait la sécrétion et la réception de ces exosomes tumoraux par les cellules tumorales. En microscopie confocale, ils démontrent que des exosomes labellisés avec de la NHS-Rhodamine (amine-reactive fluorescent labeling reagent) sont internalisés par des cellules tumorales. En effet, les exosomes marqués NHS-rhodamine colocalisent avec des compartiments de la voie endocytaire mais pas avec l'appareil de Golgi. Ils observent des colocalisations avec les endosomes précoces (marqués avec un anti-Rab5) et les lysosomes (anti-Lamp1). Pourtant, dans la suite de leur étude, basée sur des essais de fusion impliquant le R18, les auteurs s'opposent à l'hypothèse que les exosomes puissent être endocytés. Lors de la fusion de deux membranes lipidiques dont l'une est marquée au R18, la dilution de ce colorant lipophile fluorescent augmente l'émission de sa fluorescence. Des exosomes marqués au R18, ont été incubés sur des cellules tumorales et l'émission de la fluorescence a été mesurée jusqu'à 30 minutes après l'ajout des exosomes, leur permettant d'affirmer des événements de fusion quasi ininterrompus entre les lipides exosomaux et les lipides cellulaires. Ils ont ensuite montré que le taux de fusion des exosomes avec la membrane plasmique était amélioré sous un pH acide reproduisant le microenvironnement des cellules tumorales *in vivo*. Lorsqu'ils observent au microscope confocal les exosomes R-18 incubés sur des cellules dont les lipides ont été marqués au PKH67, ils constatent une colocalisation des exosomes avec la membrane plasmique mais également avec les membranes intracellulaires (Parolini et al., 2009). Il se pourrait donc que les exosomes fusionnent avec la membrane plasmique (ce que les auteurs affirment) et/ou que les exosomes fusionnent avec la membrane limitante des endosomes après leur endocytose. D'autant plus que la condition d'un pH acide est remplie par les compartiments de la voie endocytaire. Les mécanismes régissant l'internalisation des exosomes sont donc loin d'être totalement élucidés.

En 2011, le groupe d'Adrian E. Morelli s'est à nouveau penché sur l'internalisation des exosomes par les cellules dendritiques. Dans cette étude, ils ont utilisé des exosomes de BMDC (*bone marrow-derived cells* = cellules dendritiques issues de la moelle osseuse) labellisés avec du pHrodo, un colorant qui émet une fluorescence rouge lorsqu'il est au pH du phagosome. Les BMDC acceptrices cultivées en présence d'exosomes pHrodo se sont mises à émettre de la fluorescence rouge traduisant la phagocytose des exosomes. Ce phénomène serait dépendant de la température et mettrait en jeu le cytosquelette et l'ATPase vacuolaire à protons. Ces observations ont été confirmées *in vivo* avec l'injection d'exosomes pHrodo dans des souris et la visualisation de cellules dendritiques de la rate fluorescentes rouges et dans une moindre mesure des macrophages et des

lymphocytes B positifs. Ils ont ensuite travaillé avec des exosomes colorés au R18 (dont la fluorescence augmente proportionnellement au niveau de fusion membranaire) pour observer la fusion ou l'hémifusion des exosomes avec les membranes des DC acceptrices. Comme Parolini *et al*, ils ont constaté que la présence de filipine (qui se fixe au cholestérol et le séquestre) perturbait l'allumage du R18, ce qui signifierait que la fusion/l'hémifusion des exosomes avec leurs cellules receveuses impliquent des microdomaines enrichis en cholestérol. Le fait que les exosomes échangent R18 avec la membrane plasmique des DC ne signifie pas qu'une fusion totale ait lieu à cet endroit. C'est pour cette raison que les auteurs prennent la précaution de parler également d'hémifusion : le R18 présent sur le feuillet externe de la membrane exosomale peut se retrouver dans le feuillet externe de la membrane plasmique dès que les deux feuillets s'unissent et cela suivi ou non d'une fusion totale. L'observation en microscopie électronique d'exosomes marqués aux billes d'or attachés à la membrane plasmique et dans des phagosomes (dans le lumen ou accolés à la membrane limitante) suggère que les exosomes pourraient hémifusionner avec la membrane plasmique puis être internalisés et fusionner avec la membrane du phagosome. Ils n'ont hélas pas d'images concluantes d'exosomes internalisés fusionnant avec la membrane de la vésicule qui les contient. Pour finir, ils démontrent le déchargement du contenu luminal des exosomes dans le cytosol des BMDC en utilisant des exosomes contenant une luciférine encapsulée (incapable de traverser la membrane lipidique des exosomes) et des cellules receveuses transfectées avec le plasmide codant pour la luciférase. Avec cet outil, la lumière observée par l'action de la luciférase sur la luciférine ne peut être obtenue que par déversement du contenu luminal des exosomes dans le cytosol des cellules receveuses. Technique élégante qui confirme la façon dont les miR se retrouvent dans le cytosol des cellules et peuvent ainsi y jouer leur rôle régulateur (Montecalvo *et al.*, 2011).

Cette étude récente n'est pas la seule à suggérer que l'internalisation des exosomes passerait par la phagocytose. En effet, Du Feng *et al* ont démontré que des exosomes de cellules K562 ou de MT4 (HTLV-1 transformed T-lymphoblastoid cell line) sont internalisés de façon plus efficace par des phagocytes que par des cellules non-phagocytaires. Ils ont notamment observé que non seulement les exosomes se retrouvent entourés d'extensions de la membrane cellulaire et sont présents dans de large phagosomes mais surtout qu'ils sont internalisés conjointement avec des traceurs de la phagocytose. De plus, l'extinction de la dynamine 2, un élément du cytosquelette fortement impliqué dans la phagocytose, inhibe l'entrée des exosomes dans ces cellules (Feng *et al.*, 2010).

Le fait que les exosomes assurent le transfert de miR fonctionnels dans les cellules receveuses permet d'affirmer que le contenu luminal de ces vésicules s'est déversé dans le cytosol cellulaire. Néanmoins, les processus par lesquels ce mécanisme de communication cellulaire passe, doivent encore être étudiés.

III. La voie endocytaire dans les neurones

Les neurones sont des cellules spécialisées et très compartimentalisées. Ils se composent d'un corps cellulaire (le soma) d'où partent les dendrites et l'axone. Les dendrites reçoivent les messages nerveux au niveau des synapses, et les propagent jusqu'au soma puis à l'axone. Le terme « synapse » désigne une zone de contact fonctionnelle établie entre un corpuscule terminal de neurone et une cellule cible qui peut être un autre neurone ou une cellule effectrice (par exemple, une cellule musculaire). On parle de « synapse chimique » lorsque cette zone de communication entre deux neurones (ou un neurone et une cellule effectrice) met en jeu un message véhiculé par un neurotransmetteur.

Les neurones sont des cellules extrêmement polarisées et dont la surface est extraordinairement étendue. La composition protéique et lipidique de la membrane plasmique n'est pas uniforme et est déterminante pour leur bon fonctionnement. La voie endocytaire joue un rôle prépondérant dans le maintien de la composition protéo-lipidique membranaire et participe notamment à la régulation homéostatique des récepteurs membranaires. Les compartiments endocytaires des neurones ne sont pas répartis uniformément dans le cytosol :

- Les endosomes précoces ont une morphologie tubulo-vésiculaire et sont situés dans les dendrites et les terminaisons présynaptiques. Ces compartiments peuvent avoir un diamètre allant de 50 nm à quelques micromètres. On peut aussi trouver des endosomes précoces dans le corps cellulaire, mais aucune structure de ce type n'est observée dans les axones (Cooney et al., 2002).
- Les endosomes de recyclage sont présents essentiellement dans les dendrites (Park et al., 2006).
- Les endosomes multivésiculés sont généralement localisés le long des dendrites et dans le corps cellulaire et sont plus rarement observés dans les axones. Leur diamètre est compris entre 300 et 500nm et ils sont transportés le long des microtubules neuritiques (Von Bartheld and Altick, 2011) (Figure 19).
- Les endosomes tardifs et les lysosomes sont essentiellement concentrés dans le corps cellulaire autour de l'appareil de Golgi, et dans le segment proximal des dendrites (Parton et al., 1992).

Dans les neurones, l'étude de la voie endolysosomale est indissociable du trafic des récepteurs aux neurotransmetteurs à la synapse. Nous nous intéresserons ici plus particulièrement aux récepteurs au glutamate.

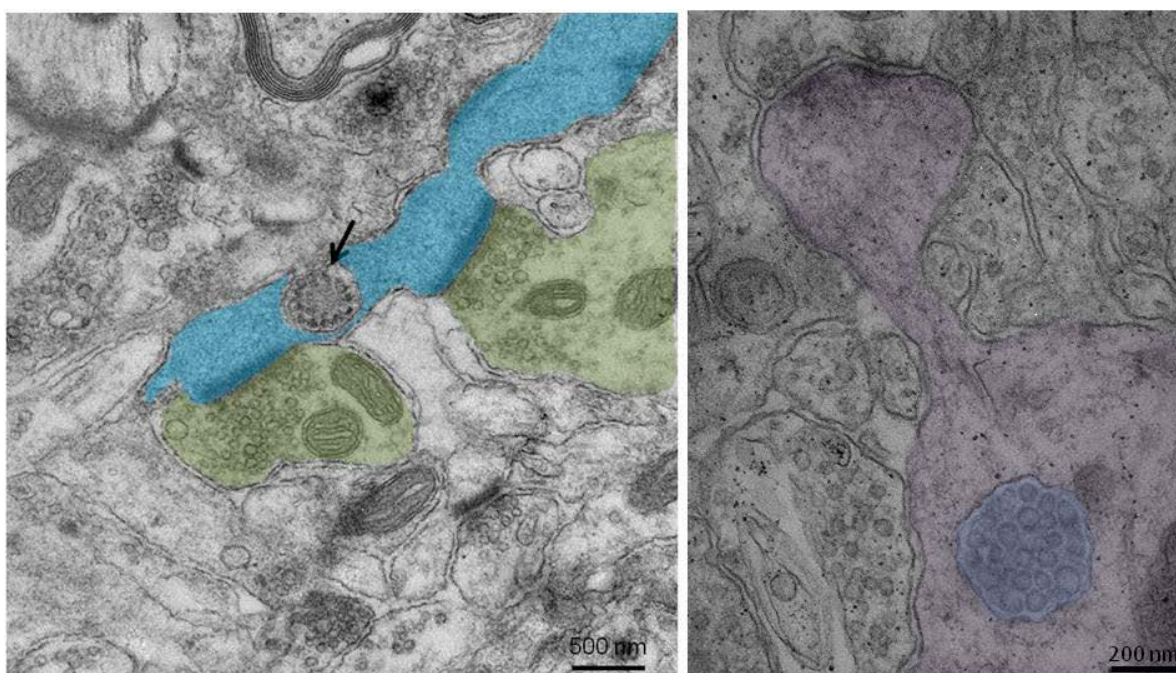


Figure 19 Micrographes électroniques de MVE localisés dans des dendrites. Observation en MET de tranche d'hippocampe (dans la partie CA1) d'un cerveau de rat adulte. A gauche, le MVE repéré à l'aide d'une flèche se trouve dans une dendrite (colorée en bleu) présentant deux densités post-synaptiques bien distinctes, correspondant à des zones d'ancrage des récepteurs aux neurotransmetteurs. Ces derniers sont relargués dans des vésicules synaptiques dont la présence permet de repérer les extrémités pré-synaptiques (colorées en vert). A droite, le MVE est localisé sous une protubérance de la dendrite (colorée en violet) qui correspond à une épine dendritique, élément post-synaptique par excellence (Fiona Hemming).

1. Endocytose des récepteurs au glutamate et plasticité synaptique

Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur le plus répandu dans le système nerveux central (SNC). Il est également le précurseur du GABA (acide γ -aminobutyrique), qui est le principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC. Le glutamate intervient dans les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation, au niveau de l'hippocampe et du cortex.

i. Les récepteurs au glutamate

Le glutamate possède deux types de récepteurs :

- les récepteurs ionotropiques, des récepteurs-canaux qui s'ouvrent après la fixation du glutamate. L'ouverture des récepteurs induit une dépolarisation dans la membrane post-synaptique, qui peut se propager jusqu'au corps cellulaire.
- les récepteurs métabotropiques, qui, une fois le glutamate fixé, vont permettre la transduction du signal à l'intérieur du neurone par l'intermédiaire des protéines G auxquelles ils sont couplés.

Il existe trois types de récepteurs ionotropiques au glutamate : AMPA, NMDA et kaïnate. L'AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate) et le NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique) sont des agonistes de synthèse du glutamate, et le kaïnate est un autre agoniste issu de l'algue rouge *Digenea Simplex*.

Les récepteurs AMPA sont des hétéro-tétramères constitués de l'assemblage de 4 sous-unités appelées GluR (numérotées de 1 à 4). On trouve essentiellement dans les neurones des récepteurs composés de GluR2 associés à GluR1 ou GluR3. Lorsque le glutamate se fixe aux GluR, le canal s'ouvre et laisse passer des ions Na^+ et K^+ . Les récepteurs AMPA dépourvus de la sous-unité GluR2 peuvent aussi laisser entrer le Ca^{2+} dans la cellule ; alors que la présence de cette sous-unité GluR2 rend les récepteurs imperméables au Ca^{2+} (Wang et al., 2002).

Les récepteurs NMDA sont des tétramères formés de deux sous-unités NR1 et deux sous-unités NR2 (NR2A à D, dont l'expression évolue au cours du développement). Les NMDAR sont perméables au Ca^{2+} , Na^+ et K^+ . Le canal est bloqué par un ion Mg^{2+} qui est éjecté lorsque la membrane est dépolarisée, permettant ainsi le passage des ions à travers le canal. L'ouverture optimale du canal nécessite également la fixation d'un autre agoniste de ces récepteurs, la glycine.

Les récepteurs de type kaïnate sont formés de 4 sous-unités (parmi GluR5, GluR6, GluR7, KA 1 et 2). Ils sont perméables aux ions Na^+ et K^+ , et sont présents en pré- et en post-synaptique.

Les récepteurs métabotropiques au glutamate sont des homodimères à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétéro-trimériques. Il en existe trois familles : mGluR1 et

5 sont couplés aux protéines Gq, qui induit l'activation de la phospholipase C. Cette famille est surtout présente au niveau post-synaptique. Les deux autres familles contiennent les mGluR2 à 4 et 6 à 8, qui sont couplés aux protéines Gs, qui activent l'adénylate cyclase. Ces deux familles se situent plutôt en pré-synaptique et agissent comme modulateurs de la libération du glutamate.

ii. Epine dendritique et densité post-synaptique

Dans les synapses glutamatergiques, la partie post-synaptique est le plus souvent située sur une épine, excroissance du tronc dendritique pouvant mesurer plus d' $1\mu\text{m}$ de long (Figure 19). La taille, le nombre et la morphologie des épines sont très variables et une même épine peut subir d'énormes changements au cours du temps. Une des théories de l'existence des épines serait la compartimentalisation des événements biochimiques qui se produisent à la synapse. En effet, le cou des épines forme un rétrécissement qui pourrait physiquement ralentir la diffusion des molécules, comme par exemple le Ca^{2+} , jusqu'au tronc dendritique, ou simplement confiner dans une zone restreinte tous les éléments nécessaires au fonctionnement de la partie post-synaptique.

Les épines arborent une densité post-synaptique (PSD) qui consiste en un échafaudage très complexe de multiples protéines, responsable de l'ancrage des récepteurs près des sites de sécrétion de neurotransmetteurs (Sheng, 2001). Située sous la membrane plasmique, la PSD apparaît comme une zone dense aux électrons en face du bouton pré-synaptique en microscopie électronique (Figure 19). Parmi les protéines de la PSD, se trouve la PSD-95 (*post-synaptic density protein 95*) qui jouerait un rôle dans l'ancrage des récepteurs dans la densité post-synaptique en supprimant leur diffusion latérale et leur internalisation (El-Husseini et al., 2000; Han and Kim, 2008).

Au niveau d'une synapse, le nombre de récepteurs AMPA présents à la membrane post-synaptique détermine directement l'amplitude de la réponse à une libération de glutamate. Plus il y a de récepteurs AMPA en surface, plus l'amplitude de la dépolarisation (PPSE, potentiel post-synaptique exciteur) sera importante. Les récepteurs AMPA peuvent être enlevés ou ajoutés à la membrane post-synaptique, donnant lieu à une plasticité importante de la synapse. L'apport et le retrait des AMPAR à la synapse peuvent se faire par diffusion latérale à partir de récepteurs déjà présents en surface depuis une zone extra-synaptique, et/ou par endocytose et exocytose des récepteurs.

iii. Endocytose des récepteurs au glutamate

Il semblerait qu'au niveau des épines, il existe une zone privilégiée d'endocytose (EZ) adjacente à la densité post-synaptique, marquée par la clathrine et régulée par l'actine, dont l'établissement est indépendant de l'activité synaptique (Blanpied et al., 2002). La présence de ces zones stables d'endocytose évoque l'idée d'un traitement local des modifications structurales des épines (taille de l'épine, nombre de récepteurs à la synapse), plutôt qu'un transport depuis le corps cellulaire (Hirling, 2009). Pour être endocytés, les récepteurs doivent se détacher de la PSD, puis migrer latéralement jusqu'à la zone d'endocytose (EZ). L'endocytose des AMPAR est dépendante de la protéine Rab5 et de son interaction avec EEA1 (Selak et al., 2006). Une fois internalisés, les récepteurs AMPA sont triés dans les endosomes précoces, puis sont soit renvoyés à la membrane plasmique en passant par les endosomes de recyclage, soit dirigés vers la dégradation (Figure 20). Le recyclage des récepteurs à la surface nécessite la présence d'une EZ fonctionnelle, ce qui suggère un couplage local entre les mécanismes d'exocytose et d'endocytose.

Les endosomes présents dans les épines dendritiques permettent par fusion avec la membrane plasmique l'insertion au niveau des synapses des protéines nécessaires à leur fonction. Ils sont aussi une source de membrane en soi, c'est-à-dire qu'indépendamment de l'apport de récepteurs, ils fournissent de la membrane pour la formation et l'élargissement des épines dendritiques. En effet, l'expression d'un mutant dominant négatif de Rab4 n'altère pas la distribution des sous-unités GluR1 des récepteurs AMPA ; en revanche, il provoque une réduction drastique de la taille des épines dendritiques (Brown et al., 2007b). Les remodelages membranaires qui se produisent durant la formation des épines, comme durant les modifications des épines matures, nécessitent donc un trafic endocytaire important. Les endosomes tubulaires sont fréquemment observés à l'intérieur des épines, tandis que les endosomes multivésiculés sont préférentiellement situés à leur base (Cooney et al., 2002). Il a été observé que sur la totalité des endosomes présents dans les dendrites, 70% sont situés à la base ou à l'intérieur des épines (Kennedy and Ehlers, 2006; Park et al., 2006).

L'exocytose des récepteurs peut, quant à elle, se produire directement dans l'épine, ou au niveau du tronc dendritique. L'insertion de nouveaux récepteurs dans la membrane des dendrites nécessite ensuite une diffusion latérale des récepteurs jusqu'aux sites synaptiques. Cette diffusion latérale des récepteurs en surface a été observée par l'équipe de Daniel Choquet à Bordeaux, par une technique de marquage de surface avec des anticorps couplés à des *Quantum dots* suivis en vidéo-microscopie. Les sous-unités GluR2 présentes à la surface montrent une grande mobilité avec des périodes de stabilité réversible correspondant aux passages dans les parties post-synaptiques où les récepteurs sont ancrés par les protéines de la PSD (Heine et al., 2008).

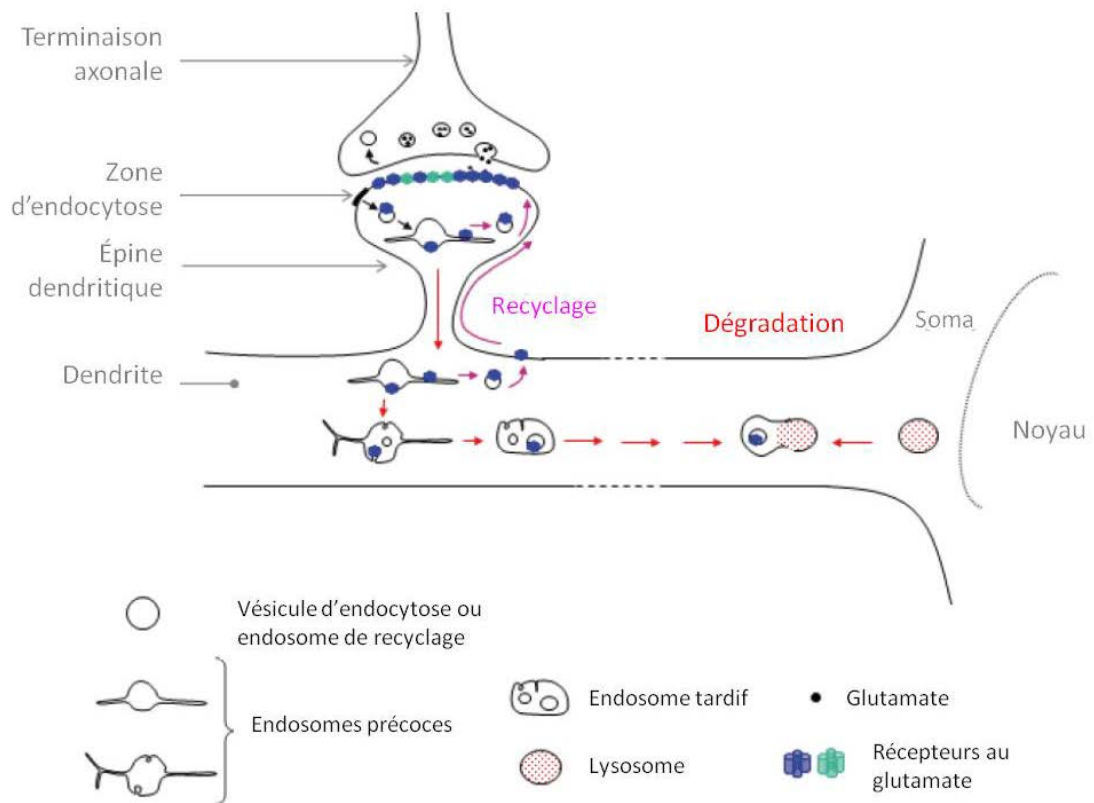


Figure 20 Représentation schématique de la voie endolysosomale dans un neurone. Au niveau de l'épine dendritique (partie post-synaptique), l'endocytose des récepteurs a lieu au niveau de la zone d'endocytose, localisée à proximité de la densité post-synaptique. Les épines dendritiques contiennent des endosomes précoces ; des endosomes tubulovésiculaires et multivésiculés sont localisés à leurs pieds ; les lysosomes sont, quant à eux, centralisés au niveau du soma.

iv. Régulation de l'endocytose des récepteurs au glutamate

Dans les neurones corticaux en culture, le blocage de l'activité neuronale par la TTX (tétrodotoxine, un inhibiteur des canaux sodiques voltage-dépendant) réduit l'endocytose des AMPAR. Au contraire, une activation des synapses glutamatergiques par blocage des récepteurs inhibiteurs GABAergiques avec la bicuculline, augmente l'endocytose et la réinsertion des AMPAR à la membrane plasmique. Cette modulation du trafic endocytose-recyclage des AMPAR par l'activité synaptique dépend de l'activation des récepteurs NMDA et du Ca^{2+} intracellulaire (Beattie et al., 2000; Ehlers, 2000). Le trafic endocytaire des récepteurs AMPA à la synapse est donc étroitement lié à l'activité neuronale, et en particulier à l'activation des récepteurs NMDA.

En fonction d'une stimulation spécifique des récepteurs AMPA ou NMDA, le trafic des récepteurs AMPA est différent et semble contrôlé par les sous-unités présentes dans le tétramère de l'AMPA. L'apport des récepteurs AMPA à la membrane post-synaptique lors d'une activation des récepteurs NMDA est contrôlé par la sous-unité GluR1 (Passafaro et al., 2001), tandis que le retrait des AMPAR lors d'une activation des récepteurs au glutamate est sous le contrôle de la sous-unité GluR2 (Lee et al., 2004).

Ainsi, Ehlers *et al* ont observé qu'après application d'AMPA ou de NMDA dans des cultures de neurones d'hippocampe, les AMPAR sont internalisés et localisés dans les endosomes tubulovésiculaires présents le long des dendrites. Dans les deux minutes qui suivent la stimulation, la sous-unité GluR1 colocalise avec les protéines EEA1 et Rab5. En présence d'AMPA, GluR1 est ensuite redirigé vers les endosomes tardifs (marqués par la protéine Lamp1), tandis qu'après une stimulation des récepteurs NMDA, GluR1 a plutôt tendance à être dirigé vers les endosomes de recyclage (colocalisation avec Rab11 et le TfR). En 30 minutes, les AMPAR sont renvoyés à la membrane plasmique après une brève stimulation au NMDA, tandis que 6h après la stimulation à l'AMPA, le signal intracellulaire des sous-unités GluR1 diminue significativement, évoquant une dégradation de la protéine (Ehlers, 2000).

Les épines dendritiques (et les parties post-synaptiques en général) sont donc des structures hautement dynamiques où le *pool* de récepteurs aux neurotransmetteurs est en permanence modifié en fonction de l'activité synaptique.

v. Voie endocytaire et plasticité synaptique

En 1949, le postulat de Hebb propose que, lorsqu'un neurone prend part de façon répétée à l'activation d'un autre neurone, l'efficacité des connexions entre ces neurones est augmentée. La plasticité synaptique correspond aux modifications morphologiques, chimiques et fonctionnelles qui interviennent au cours du temps au niveau des synapses, modulant ainsi la transmission synaptique. Les synapses ne sont pas figées, elles évoluent avec le temps, certaines disparaissent, d'autres se créent, et toutes se modifient et tendent, soit à renforcer, soit à affaiblir, la communication entre deux neurones. La plasticité synaptique serait ainsi à la base des processus d'apprentissage et de mémorisation.

La plasticité synaptique comprend des phénomènes d'habituation, de sensibilisation (ou désensibilisation), de potentialisation et de dépression. Elle est particulièrement remarquable dans les événements de potentialisation et de dépression à long terme (LTP, *Long Term Potentiation* et LTD, *Long Term Depression*). La LTP et la LTD représentent, respectivement, une augmentation et une diminution de l'efficacité de la transmission synaptique à long terme. Dans le cerveau des mammifères, l'hippocampe est le lieu central de l'apprentissage. La découverte de la LTP, en 1966, a été faite chez le lapin au niveau des synapses entre la voie perforante (VP) en provenance du cortex, et le gyrus denté de l'hippocampe. L'intensité des PPSE enregistrés au niveau du gyrus denté en réponse à une stimulation de la voie perforante peut être augmentée durablement si l'on réalise au préalable une stimulation à haute fréquence (stimulation tétranique, 100Hz) des fibres pré-synaptiques (LTP). Un tel phénomène a pu être observé des années plus tard dans d'autres parties du cerveau, comme le cortex, le cervelet et l'amygdale. A l'inverse, des stimulations répétées à basse fréquence (1Hz, voire moins), sont capables de diminuer les réponses post-synaptiques (LTD).

Un des modèles actuels repose sur un rôle central joué par les NMDAR dans la plasticité synaptique, de par leur capacité à ne s'ouvrir en présence de glutamate que lorsque la membrane post-synaptique est dépolarisée. Ils jouent donc un rôle de « détecteurs de coïncidence » capable de réagir à une dépolarisation pré-synaptique (libération de glutamate) et post-synaptique (ouverture des canaux AMPA) simultanées. On sait que le flux de Ca^{2+} à travers les NMDAR déclenche des cascades de signalisation dont une des conséquences est une augmentation du nombre de récepteurs AMPA à la surface post-synaptique. Cette augmentation du *pool* d'AMPA de surface permet d'accroître la dépolarisation post-synaptique pour une même libération de glutamate.

Lors d'une potentialisation à long terme, on observe non seulement une relocalisation des récepteurs au glutamate à la membrane post-synaptique, mais également une augmentation de la taille des épines dendritiques. Sur des neurones d'hippocampe en culture, une stimulation mimant

les effets d'une LTP (LTP dite « chimique ») provoque une relocalisation des endosomes de recyclage depuis la base vers l'intérieur des épines. Le blocage de la fusion des endosomes de recyclage avec la membrane plasmique par surexpression d'un mutant inactif de la SNARE Syntaxine 13, inhibe la croissance de l'épine observée lors de l'induction de la potentialisation à long terme dans ces cultures (Park et al., 2006).

A l'inverse, dans une LTD, l'expression de surface post-synaptique des GluR diminue, ce qui entraîne une chute de l'amplitude des PPSE. La LTD semble elle aussi dépendre du Ca^{2+} , et il existerait un couplage entre l'entrée de Ca^{2+} et l'internalisation des AMPAR (Hanley and Henley, 2005).

Les mécanismes d'endocytose et d'exocytose sont à la base des processus synaptiques. De ce fait, la voie endocytaire joue un rôle majeur dans la physiologie neuronale. Or, il faut noter que dans de nombreuses maladies neurodégénératives, les neurones contiennent des endosomes anormaux par leur morphologie et leur composition protéique, reflets d'un système endolysosomal perturbé. Ainsi, des observations morphologiques de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer révèlent la présence dans les neurones d'endosomes aberrants, caractérisés par une grande taille et par une mixture de marqueurs des endosomes précoces (Rab5, EEA1), de recyclage (Rab4) et tardifs (récepteur du Manose-6-phosphate). Des endosomes aberrants sont également observés chez des neurones de patients atteints de sclérose amyotrophique latérale (ALS, *Amyotrophic Lateral Sclerosis*), du syndrome de Down ou encore de la maladie de Niemann-Pick (Nixon, 2005). En outre, de plus en plus d'études suggèrent que la propagation de certaines protéines pathogènes à travers le SNC impliquerait la voie endocytaire par le biais des exosomes (Bellingham et al., 2012).

2. Les exosomes dans le système nerveux

i. Dans le système nerveux physiologique

Il a été démontré *in vitro* que tous les types cellulaires du SNC sont capables de sécréter des exosomes. Ces derniers ont été purifiés à partir des surnageants de cultures primaires de microglie (Potolicchio et al., 2005), d'oligodendrocytes (Kramer-Albers et al., 2007), d'astrocytes (Taylor et al., 2007) et de neurones (Faure et al., 2006). De plus, des exosomes ont été retrouvés dans du liquide céphalo-rachidien (Vella et al., 2008), renforçant la possibilité d'une sécrétion par les cellules nerveuses *in vivo*.

Dans notre laboratoire, Julien Fauré et ses collaborateurs ont démontré que des cultures primaires de neurones corticaux à 8 jours de culture *in vitro* (DIV, *Days in vitro*) sont capables de sécréter des exosomes et que cette sécrétion est augmentée lorsque les neurones sont incubés dans une solution dépolarisante contenant 25 mM de KCl. Ces résultats suggèrent que la libération d'exosomes par les neurones peut être régulée par une entrée de calcium dans la cellule, voire régulée d'une manière

activité-dépendante. En outre, certaines sous-unités des récepteurs AMPA, les sous-unités GluR2/3, ont été retrouvées dans les exosomes de neurones corticaux. En revanche, la sous-unité NR1 des récepteurs NMDA n'est pas sécrétée via ces exosomes. Ceci laisse penser que la sécrétion exosomale pourrait modifier l'efficacité synaptique. En effet, les exosomes sécrétés pourraient permettre l'élimination, par le neurone, de récepteurs AMPA exprimés à sa surface. Il est possible d'imaginer que ces récepteurs contenus dans les exosomes puissent être repris et ré-exprimés par d'autres neurones, modifiant ainsi les propriétés membranaires de ces derniers. Enfin, il est intéressant de noter que les exosomes neuronaux présentent à leur surface la molécule d'adhésion cellulaire L1_{CAM} susceptible d'assurer leur fixation aux neurones et la protéine PrP-c dont la forme *scrapie* est l'agent infectieux responsable des maladies à prion (Faure et al., 2006).

En collaboration avec la plateforme de microscopie électronique de l'institut, Gaëlle Lachenal a observé des coupes de neurones corticaux à 15 DIV en culture. Ses observations en MET ont révélé la présence de vésicules de taille homogène, d'environ 60 nm, fixés en chapelet à la surface des cellules. Gaëlle a également pu observer des microvésicules semblables capturées dans des puits de clathrine (Figure 21). Ces observations réalisées sur des cultures primaires de neurones suggèrent que les exosomes pourraient se fixer et être endocytés par les neurones.

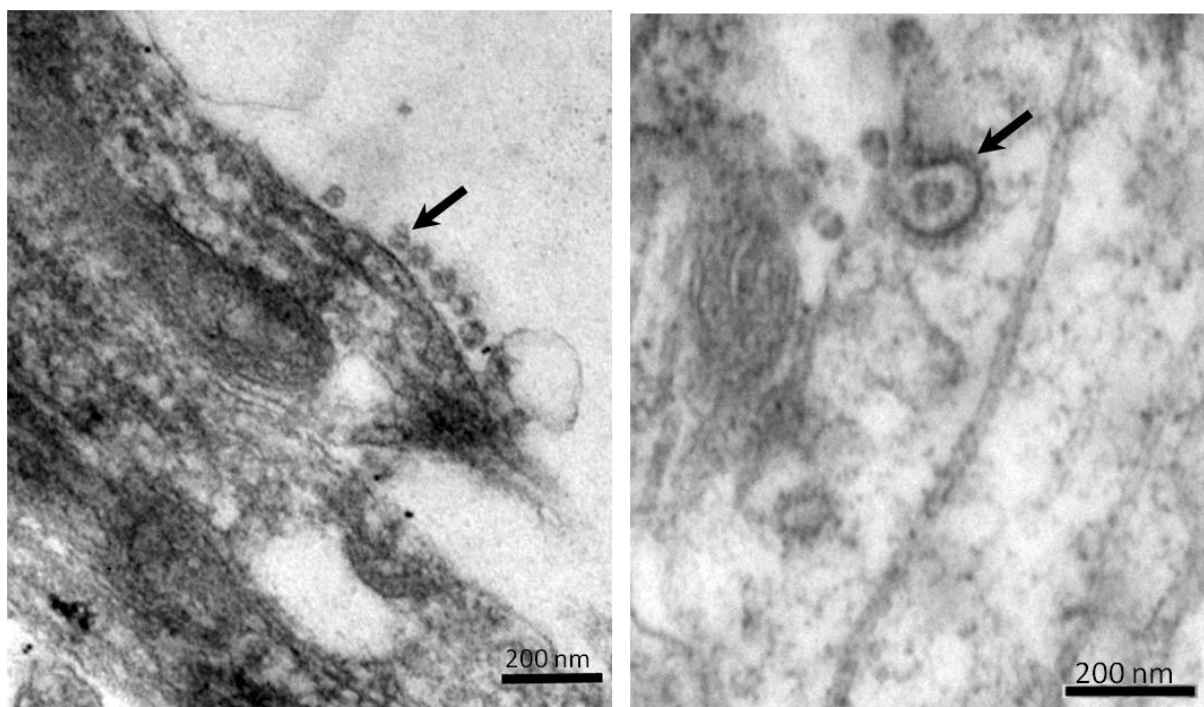


Figure 21 Micrographes électroniques de vésicules semblables à des exosomes dans des neurones en culture. Des cultures de neurones corticaux (15 DIV) ont été stimulées 1min à la ionomycine (2 μ M), immédiatement fixées, puis des coupes en époxy ont été préparées pour l'observation en MET. Sur l'image de gauche, un chapelet de vésicules *exosome-like* est visible à la surface cellulaire. Sur l'image de droite, une vésicule semblable par la taille et la morphologie à un exosome est emprisonnée dans un puits recouvert de clathrine (G. Lachenal, coll. K. Pernet-Gallay).

Les études portant sur les exosomes d'astrocytes et de microglie renforcent l'idée que ces vésicules extracellulaires joueraient de multiples rôles dans le système nerveux. Les astrocytes sécrètent des exosomes contenant la protéine chaperonne Hsp70 et la synapsine I en réponse à un stress (choc thermique ou stress oxydatif) (Taylor et al., 2007; Wang et al., 2011). Wang et al ont observé que la synapsine I sécrétée par les astrocytes promeut la survie neuronale et la poussée dendritique de neurones d'hippocampe. De plus, les exosomes de microglie transportent l'appareil métabolique nécessaire à une glycolyse anaérobie (production de lactate). Ils contiennent notamment un transporteur du lactate, le MCT1 (monocarboxylate transporter 1) et des enzymes glycolytiques (Potelicchio et al., 2005). Leur sécrétion via les exosomes pourrait représenter une source d'énergie supplémentaire pour les neurones environnants. Dans un espace aussi confiné que le cerveau, les exosomes pourraient représenter un nouveau mode de coopération entre les astrocytes, la microglie et les neurones (Figure 22).

Il a également été démontré que les oligodendrocytes sécrètent des exosomes. Dans le SNC, les oligodendrocytes jouent un rôle majeur dans la propagation des influx nerveux en formant des gaines isolantes de myéline autour des axones. Elles procèdent en enroulant des élongations de leur membrane plasmique autour de segments axonaux, entraînant une propagation saltatoire du potentiel d'action. La myéline est une substance composée de lipides (sphingolipides, cholestérol...) et de protéines dont la MBP (*myelin basic protein*) et la PLP (*proteolipid protein*) sont les plus abondantes. La PLP s'accumule dans des compartiments endosomaux tardifs de stockage, dont les MVE. Il a été montré que les exosomes d'oligodendrocytes contiennent la PLP et la MBP et que leur composition lipidique se rapproche de celle de la myéline (Kramer-Albers et al., 2007). Il est envisageable que cette sécrétion exosomale ait lieu pour équilibrer les niveaux cellulaires des composants de la myéline et leur renouvellement (*turnover*). En outre, un oligodendrocyte est capable de réaliser et de coordonner la myélinisation d'axones distincts et ce jusqu'à cinquante segments différents à la fois. Dans le SNC, les facteurs inhibant la myélinisation axonale sont peu connus. En 2011, le groupe de Mikael Simons a suggéré l'implication des exosomes d'oligodendrocytes dans la régulation de ce processus. D'après leurs travaux, ces exosomes n'influencent pas la différenciation des cellules-précurseurs d'oligodendrocytes mais régulent l'extension membranaire de ces dernières. Les exosomes inhiberaient la myélinisation en régulant l'expansion de la surface cellulaire des oligodendrocytes (Bakhti et al., 2011). Il serait également concevable que les oligodendrocytes fournissent aux axones des molécules trophiques par le biais des exosomes. Néanmoins, la participation des exosomes d'oligodendrocytes en tant que support trophique pour les neurones reste encore à déterminer.

Dans les cellules non neuronales, il a été démontré que les exosomes représentaient un nouveau moyen de communication intercellulaire par l'échange de protéines et d'ARN. Si cette voie de communication existe dans le système nerveux, elle permettrait des échanges antérogrades et rétrogrades entre les neurones qui participeraient efficacement au bon fonctionnement du système nerveux en général et à la plasticité synaptique en particulier. Récemment, Xin *et al* ont publié que les exosomes sécrétés par des cellules stromales mésenchymateuses (CSM) influençaient la poussée neuritique par l'action du miR133b contenu dans leurs exosomes (Xin *et al.*, 2012). Les CSM sont définies comme des progéniteurs non hématopoïétiques caractérisés par leur capacité d'adhérence au plastique, l'expression de marqueurs phénotypiques non spécifiques et leur potentiel de différenciation en cellules de la voie mésodermique. Résidant dans de nombreux tissus, les sources disponibles de cellules stromales mésenchymateuses sont multiples et incluent à la fois les tissus adultes et les tissus fœtaux. Après leur administration, les CSM migrent préférentiellement vers les tissus endommagés. Ces cellules ont un effet bénéfique dans de nombreux modèles animaux de lésions tissulaires par un mécanisme non encore défini (Roux *et al.*, 2011). Hongki Xin et ses collaborateurs se sont intéressés aux CSM dans un contexte d'ischémie cérébrale. Ils ont émis l'hypothèse que leur potentiel thérapeutique provenait d'un échange de microARN avec les cellules en place, c'est-à-dire majoritairement des astrocytes et des neurones. Ils sont parvenus à démontrer que les CSM sécrètent des exosomes qui, non seulement contiennent le miR133b, mais en assurent le transfert aux neurones et aux astrocytes. Enfin, en comparant le nombre d'embranchements neuritiques et la longueur totale des neurites de neurones incubés avec ces exosomes *versus* des neurones contrôles, Xin *et al* ont établi que les exosomes de CSM transportant le miR133b stimulent la croissance neuritique. L'identification de ce transfert de microARN via les exosomes explique en partie comment les CSM contribuent au rétablissement des cellules affectées par l'ischémie. Ces travaux démontrent que les exosomes peuvent être un moyen d'échange d'ARN entre les cellules du SNC.

Les exosomes apparaissent donc comme un moyen de communication et d'échange possible au sein du système nerveux (Figure 22) mais ils représentent aussi une menace pour l'organisme puisque leur nature si particulière (sécrétion, composition...) leur confère la capacité de devenir vecteurs d'agents pathogènes, notamment pour les maladies neurodégénératives.

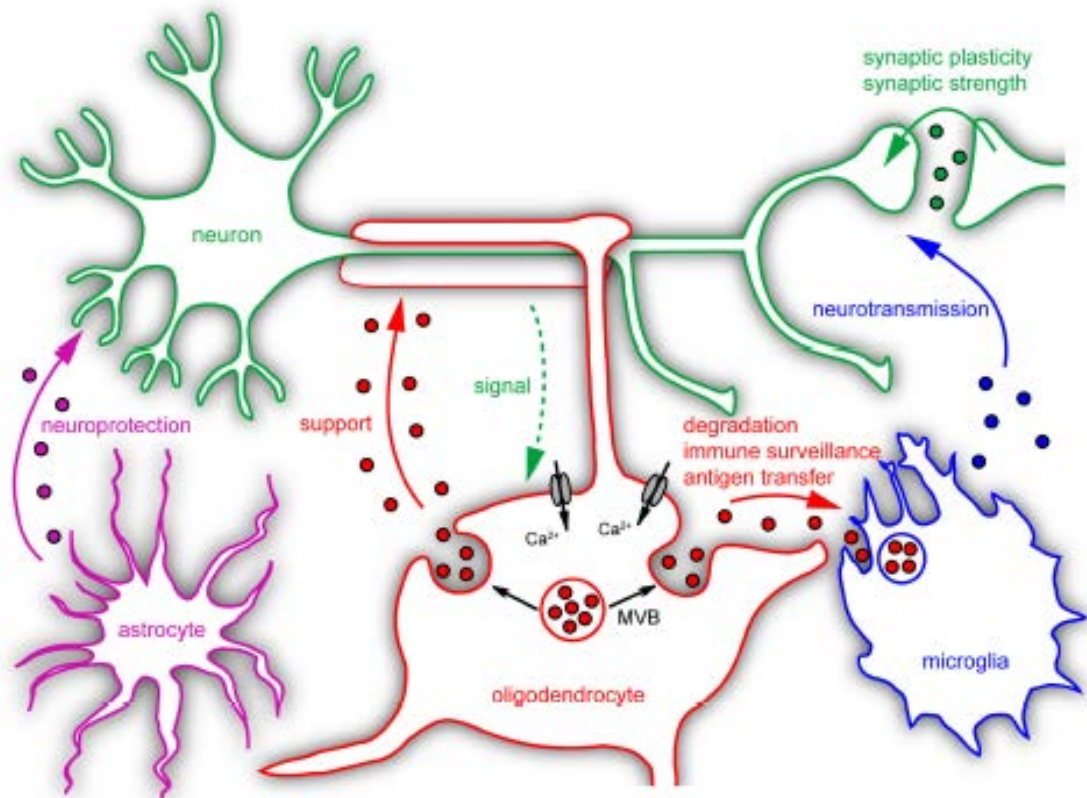


Figure 22 Modèle d'interaction des cellules du SNC par la voie des exosomes. Tous les types cellulaires présents dans le système nerveux central (SNC) sécrètent des exosomes. Les différentes études menées sur ces cellules et leurs exosomes respectifs suggèrent des rôles divers pour les exosomes libérés dans cet environnement, notamment dans la coopération et la communication intercellulaire (Fruhbeis et al., 2012).

ii. Dans le système nerveux pathologique

Ces dix dernières années, les exosomes ont été reliés à différentes maladies neurologiques, notamment la maladie d'Alzheimer.

La maladie d'Alzheimer est une neuropathologie qui se traduit entre autres par l'apparition de plaques amyloïdes dans les zones limbiques du cerveau telles que l'hippocampe dont les neurones dégénèrent progressivement. Ces plaques correspondent à l'accumulation extracellulaire du peptide beta-amyloïde (également appelé peptide A β 42 car constitué de 42 acides aminés). Ce peptide pathogène et insoluble est le produit de clivage d'une glycoprotéine membranaire, la protéine précurseur de la protéine β -amyloïde (APP). Il a été démontré que le peptide beta-amyloïde ainsi que des fragments amyloïdogènes de l'APP étaient sécrétés, en association avec des exosomes (Rajendran et al., 2006; Sharples et al., 2008; Vingtdeux et al., 2007). Ces travaux suggèrent que les exosomes joueraient un rôle actif dans la propagation des peptides pathogènes et de la dégénérescence qui se propage au cours de la pathologie, à partir des zones limbiques comme l'hippocampe vers les zones du cortex qui y sont connectées. En post-doctorat dans le laboratoire, Karine Laulagnier étudie en quoi des mutations responsables de formes génétiques de la maladie d'Alzheimer peuvent affecter la sécrétion des exosomes neuronaux.

Les études *post-mortem* de cerveaux de patients atteints de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ont permis de mettre en évidence la présence d'agrégats anormaux de tau, une protéine normalement associée aux microtubules, dans différentes zones du cerveau atteintes de neurodégénérescence. Dans le laboratoire, l'étude protéomique des exosomes de neurones corticaux n'a pas permis la détection de la protéine tau endogène. Par contre, elle a été détectée dans des exosomes sécrétés par des cellules surexprimant cette protéine (Saman et al., 2012; Simon et al., 2012) ce qui laisse penser que les exosomes pourraient permettre l'élimination de la protéine tau en excès.

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative du SNC dont l'apparition des symptômes -essentiellement moteurs- est progressive. Elle se caractérise, entre autres, par l'apparition de corps de Lewy : des agrégats de protéines dans le soma des neurones affectés. L'alpha-synucléine est une protéine exprimée par les neurones dont la fonction première est méconnue mais qui se trouve être le constituant principal des corps de Lewy. Sa sécrétion, via les exosomes, par des neuroblastomes humains (SHSY-5Y) provoque la mort cellulaire de cellules neuronales (SH-SY5Y, neurones corticaux). Ces travaux suggèrent que les exosomes pourraient permettre la dissémination de l'alpha-synucléine et participeraient à la propagation de la maladie de Parkinson dans le SNC (Emmanouilidou et al., 2010).

Les exosomes pourraient aussi participer à la propagation d'un agent infectieux atypique, le prion (mot-valise venant de l'anglais *PRO*teinaceous *IN*fectious *particle* c'est-à-dire particule infectieuse protéinique). La protéine prion PrP-c (c pour *cells*) est présente à l'état naturel dans les cellules mais sa fonction reste aujourd'hui encore méconnue. Le prion pathogène est une protéine prion PrP-c mutée qui provoque les maladies à prions (comme l'encéphalopathie spongiforme bovine). La protéine prion anormale ou PrP-sc (sc pour *scrapie*), qui est responsable de la maladie, résulte d'une modification de sa structure tridimensionnelle. Il a été découvert que PrP-c et son isoforme muté, PrP-sc, étaient associés aux exosomes sécrétés par des cellules de Schwann et des cellules épithéliales de rein de lapin exprimant PrP. En outre, des exosomes contenant PrP-sc inoculés à des souris transgéniques ont induit des troubles neurologiques caractéristiques (Fevrier et al., 2004). D'autres travaux ont renforcé l'étude de Benoît Février en démontrant que les exosomes sécrétés par des cellules infectées peuvent transmettre l'infection à des cellules originaires de tissus différents (Vella et al., 2007). De plus, Fauré et al ont démontré que les exosomes sécrétés par des neurones corticaux contenaient des quantités importantes de PrP-c (Faure et al., 2006). Il est donc envisageable que les exosomes participent à la dissémination des maladies à prion de la périphérie vers le système nerveux, puis permettent leur extension dans le SNC. Dernièrement, l'équipe d'Andrew Hill a établi le profil en microARN contenus dans les exosomes PrP-sc et a démontré qu'ils présentaient une signature en miR spécifique qui pourrait être utilisée pour le diagnostic et la compréhension des voies cellulaires impliquées dans les maladies à prion (Bellingham et al., 2012).

Les rôles physiologiques et pathologiques que pourraient jouer les exosomes neuronaux dans le SNC font l'objet d'une revue scientifique publiée par le laboratoire (appendix : article 2 (Chivet et al., 2012)).

3. Propagation de la toxine du tétanos dans le système nerveux

Comme nous venons de le décrire, le système endolysosomal est à la base de la communication synaptique entre les neurones et les exosomes pourraient participer à sa modulation et/ou représenter une nouvelle voie de communication interneuronale. De nombreuses maladies neurodégénératives ont pour origine des dysfonctionnements de la voie endocytaire et la propagation de certaines protéines pathogènes à travers le système nerveux passerait par la voie exosomale. Dans le laboratoire, nous nous sommes intéressé au mode de propagation de la toxine du tétanos.

i. La toxine du tétanos et son mécanisme d'action

Le tétanos est une maladie infectieuse causée par une bactérie anaérobie, *Clostridium tetani*, présente de manière ubiquitaire dans les sols du monde entier. L'infection passe généralement par la contamination d'une plaie par des spores de *Clostridium tetani* qui y germent, produisant des bacilles qui sécrètent une puissante neurotoxine. La toxine du tétanos (TeNT) est une Zn^{2+} -protéase, neurone-spécifique dont les deux sous-unités sont reliées par un pont disulfure. La chaîne lourde (environ 100 kDa) est responsable de la fixation et du transport rétrograde et la chaîne légère (environ 50 kDa) est responsable de l'activité protéasique toxique (Schiavo et al., 1992b). La TeNT entraîne une paralysie spasmodique (tétanie) en bloquant la sécrétion de neurotransmetteurs par les interneurons de la moelle épinière. Lors d'une infection par exemple, après une blessure avec des objets contaminés, la TeNT entre dans les motoneurons au niveau des jonctions neuromusculaires (Figure 23 (Salinas et al., 2010)). Là, elle est internalisée puis accède au SNC via un transport rétrograde le long de l'axone du neurone moteur et une migration trans-synaptique vers les interneurons selon un mécanisme encore inconnu (Price et al., 1975; Schwab et al., 1979).

L'activité enzymatique de la TeNT a pour cible la synaptobrevine II (ou VAMP2, de la famille des SNARE), qui intervient dans la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique. Dans les interneurons, la toxine clive la synaptobrevine et inhibe la libération du GABA. Le blocage de la libération du GABA provoque une paralysie (tétanie) des muscles, les interneurons contrôlant les motoneurons de la moelle épinière. Une autre toxine clostridiale, la toxine botulique (BoNT) produite par la bactérie *Clostridium botulini*, a également pour cible des SNAREs impliquées dans l'exocytose des vésicules synaptiques (Schiavo et al., 1992a). Contrairement à la TeNT, elle agit directement à la jonction neuromusculaire et inhibe la libération d'acétylcholine (cf. Figure 11).

La plupart des études menées pour caractériser la TeNT ont été réalisées avec la partie C terminale de sa chaîne lourde. Ce fragment de 451 acides aminés, couramment dénommé TTC, a gardé les propriétés de fixation et d'internalisation neuronale de la toxine entière tout en étant dépourvue de toute activité toxique.

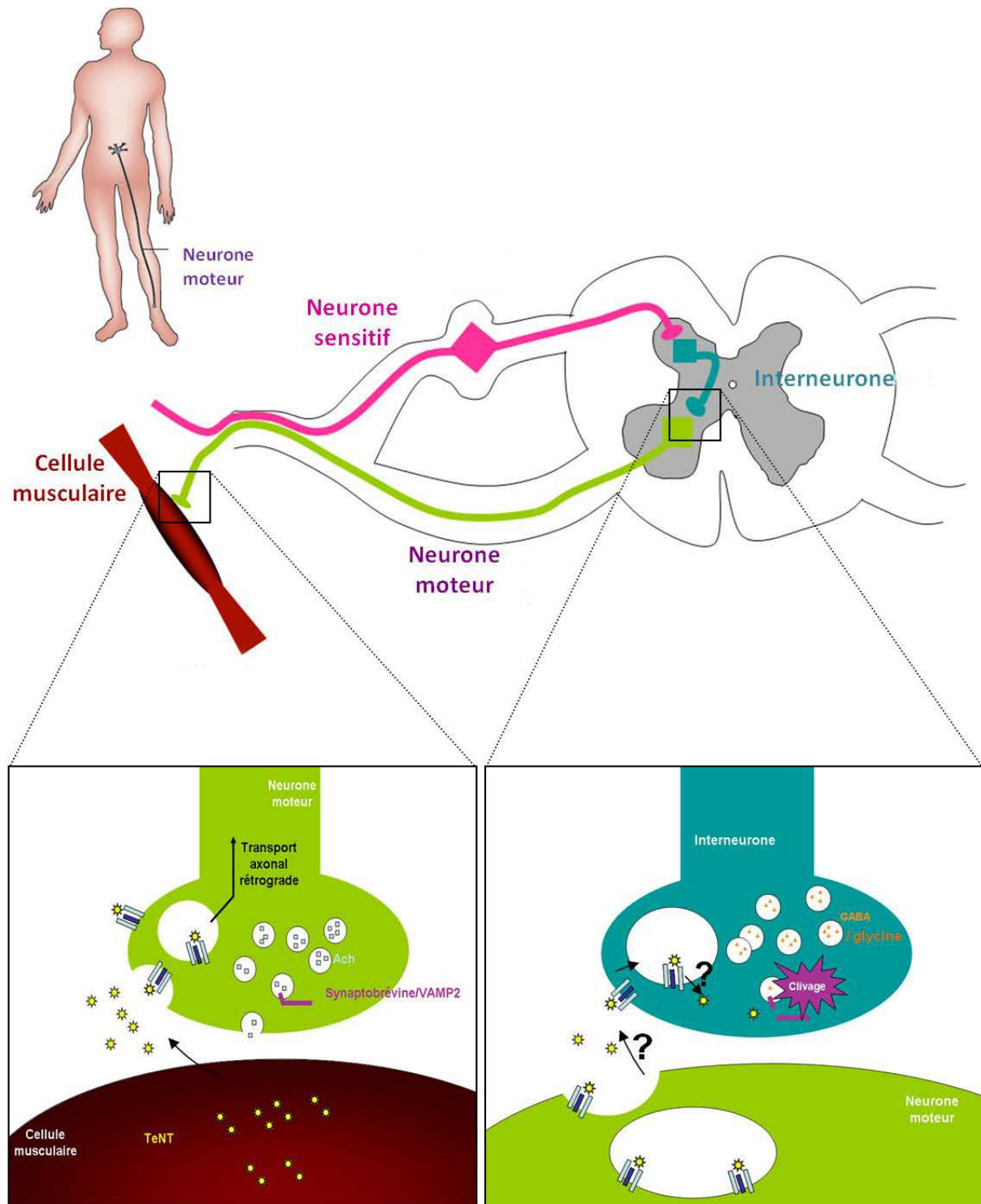


Figure 23 Mécanisme d'action de la toxine du tétanos dans l'organisme. La toxine tétanique (TeNT) entre dans le système nerveux au niveau d'un neurone moteur à la jonction neuromusculaire puis est transportée dans l'axone dans le sens rétrograde jusqu'à la synapse avec l'interneurone. La TeNT passe de façon trans-synaptique du neurone moteur à l'interneurone par un mécanisme encore inconnu. Dans l'interneurone, elle est libérée dans le cytosol par un mécanisme également mal compris. Une fois dans le cytosol, la toxine clive la synaptobrevine II et empêche la libération du GABA par ces neurones (adapté de G. Lachenal, (Salinas et al., 2010)).

ii. Mécanismes d'internalisation de la toxine dans les neurones

1. Fixation

Injectée *in vivo* à des souris en périphérie, la TTC forme des *clusters* sur la membrane pré-synaptique des jonctions neuromusculaires au niveau de puits de clathrine mais elle semble également localisée au niveau de radeaux lipidiques (*rafts*) (Roux et al., 2005). La fixation de la TeNT à la surface neuronale nécessiterait un complexe formé à la fois de lipides et de protéines. Un certain nombre d'indices relie effectivement la fixation de la TeNT à la surface des neurones avec les *rafts*. La toxine incubée sur des motoneurones est retrouvée associée à des zones de membrane insensibles aux détergents et une déplétion en cholestérol prévient les neurones contre sa toxicité (Herreros et al., 2001), tout comme le clivage des protéines à ancre GPI de surface par la phospholipase C (Munro et al., 2001). Il a été montré que la chaîne lourde de la TeNT possède deux sites de liaison à des polysialogangliosides (Rummel et al., 2003; Shapiro et al., 1997) et que de tels gangliosides, GD1b et GT1b, sont nécessaires à sa fixation (Kitamura et al., 1999). La toxine peut également se lier via sa chaîne lourde à la protéine Thy-1, une protéine neuronale à ancre GPI qui s'accumule dans les *rafts*. Toutefois, Thy-1 n'est probablement pas l'unique récepteur de la toxine puisque des souris KO pour son gène restent sensibles à la TeNT (Herreros et al., 2001). La fixation de la TeNT semble donc se jouer aux niveaux de récepteurs protéiques ancrés dans des microdomaines lipidiques. Néanmoins, les observations de Roux et al suggèrent que l'endocytose de la toxine passe par des puits de clathrine (Roux et al., 2005). L'endocytose clathrine-dépendante est pourtant différente de celle des protéines associées aux radeaux lipidiques (voie d'internalisation cavéole-dépendante et CLIC/GEEC principalement) (Howes et al., 2010).

En 2006, Deinhardt et al étudient l'endocytose de la TTC dans des motoneurones, la porte d'entrée physiologique de cette toxine. Ils confirment que la TTC est dans un premier temps piégée dans des microdomaines membranaires associée à GD1b, et observent des colocalisations de la toxine avec le ganglioside GD1b à la surface neuronale. Par la suite, la TTC est adressée à des puits recouverts de clathrine, ce qui n'est pas le cas du GD1b. C'est probablement cette étape d'adressage latéral qui nécessite l'intégrité des *rafts*. La suite de l'étude démontre que dans les neurones moteurs, l'endocytose de la toxine tétanique est dépendante de la dynamine et de la clathrine et se déroule sans le GDP1b. D'autre part, cette voie d'endocytose serait indépendante de la voie de recyclage des neurotransmetteurs (Deinhardt et al., 2006a). A contrario, la toxine botulique semble internalisée par cette voie de recyclage, via son interaction avec les synaptotagmines I et II (Montecucco et al., 2004). La principale différence de séquence peptidique entre les deux toxines se situe dans la partie C-terminale, par laquelle se fait l'interaction des toxines avec la membrane plasmique. Cette

différence pourrait expliquer qu'elles emploient des voies d'internalisation séparées et par extension, qu'elles ont des comportements distincts dans le neurone moteur.

Il faut toutefois noter que d'après la littérature, il semblerait que selon le type neuronal, la TeNT n'utilise pas les mêmes procédés d'internalisation et ainsi ne se retrouve pas dans les mêmes compartiments intracellulaires. En effet, Deinhardt *et al* ont démontré que dans les motoneurones, la TeNT est endocytée de manière clathrine-dépendante, en absence de dépolarisation et colocalise très peu avec des protéines associées aux vésicules synaptiques (SV) comme les VAMP (Deinhardt *et al.*, 2006a). D'autres études menées sur des neurones du SNC montrent au contraire que l'internalisation de la TeNT est accentuée par la dépolarisation et que ce processus impliquerait les voies de recyclage des SV au niveau des extrémités pré-synaptiques de ces neurones. C'est ce que suggèrent les travaux de Matteoli *et al* menés sur des neurones d'hippocampe en culture et ceux de Parton *et al* sur des cultures de neurones de moelle épinière (Matteoli *et al.*, 1996; Parton *et al.*, 1987).

2. Transport

L'étude menée par Parton *et al* en 1987 montre que la toxine tétanique endocytée par des neurones de moelle épinière de souris se retrouve dans les endosomes précoces au bout de 15 minutes, puis dans les endosomes multivésiculés (MVE) en 30 minutes (Parton *et al.*, 1987). En 2006, Katrin Deinhardt et ses collaborateurs publient une deuxième étude sur le trajet de la TTC dans les motoneurones. Après son internalisation, la TTC est localisée au bout de 15 minutes dans des compartiments Rab5-positifs, puis après 60 minutes elle se situe dans des compartiments marqués par Rab7 qui migrent dans l'axone. Ils constatent que la protéine Rab5 semble intervenir dans les étapes précoces du tri de la TTC car la surexpression de son dominant négatif abolit son transfert dans les compartiments de transport sans affecter son internalisation. Quant à Rab7, elle permettrait le transport axonal à proprement parler, puisqu'une surexpression de son dominant négatif provoque une stagnation de la TTC dans l'extrémité de l'axone (Deinhardt *et al.*, 2006b).

La mobilité des endosomes qui transportent la toxine dans l'axone semble assurée par plusieurs moteurs moléculaires. D'une part, la dynéine, qui ancre les compartiments de transport sur les microtubules, et d'autre part la myosine V, responsable de la mobilité le long du réseau de F-actine (Lalli *et al.*, 2003; Lalli and Schiavo, 2002). La présence concomitante des deux protéines est nécessaire au transport rétrograde des compartiments qui transportent la TeNT, ce qui suggère une coopération entre les deux mécanismes.

Il semblerait que le pH influe sur l'activité et le transport de la TeNT. Une étude menée par Boquet *et al* en 1982 a montré que des changements de pH induisent des modifications structurales de la toxine. A pH neutre, l'enzyme aurait une conformation qui lui donne un caractère plutôt hydrophile, tandis qu'à pH acide, la toxine opèrerait un changement de conformation lui donnant la capacité de former un canal transmembranaire. Ce canal pourrait permettre dans les interneurons le passage de la toxine à travers la membrane de l'endosome, et lui donner accès à la synaptobrevine II localisée dans le cytosol (Boquet and Duflot, 1982).

Dans les motoneurons, les compartiments qui transportent la TeNT se distinguent des compartiments de la voie endocytaire « classiques » puisqu'ils présentent un pH neutre et ne s'acidifient pas durant le trajet axonal (Bohnert and Schiavo, 2005). En 2009, Sara Salinas et ses collaborateurs étudient le transport de l'adénovirus CAV-2 (*canine serotype 2 adenovirus*) dans les motoneurons. Ce virus neurotrope est endocyté dans des puits recouverts de clathrine puis transporté dans des compartiments qui gardent un pH neutre tout au long du trajet jusqu'au corps cellulaire. Les chercheurs observent que la TeNT est transportée dans les mêmes compartiments que l'adénovirus, suggérant l'existence d'un mécanisme commun de transport axonal rétrograde pour ces pathogènes, par des endosomes particuliers dont le pH neutre semble permettre leur maintien dans le lumen endosomal sans qu'ils aient accès au cytosol (Salinas *et al.*, 2009).

En résumé, la TeNT entre dans le motoneurone par son extrémité pré-synaptique et remonte vers le soma par un transport rétrograde. Là elle échappe vraisemblablement à la dégradation lysosomale (Lalli and Schiavo, 2002) et passe dans l'interneurone connecté selon un mécanisme qui n'a toujours pas été élucidé (von Bartheld, 2004). En effet, la TeNT ne fait que transiter par le motoneurone alors que son action neurotoxique n'a lieu qu'une fois dans le cytosol de l'interneurone (cf. Figure 23).

3. Passage trans-synaptique

La TeNT est transcytosée du compartiment somatodendritique du neurone moteur au neurone inhibiteur de la moelle épinière adjacent. Là, la partie N-terminale de sa chaîne lourde déclenche la translocation cytoplasmique de la sous-unité active (la chaîne légère). Une fois dans le cytoplasme, l'activité endopeptidase de la chaîne légère clive la synaptobrevine II et endigue ainsi la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane cellulaire, empêchant la sortie des neurotransmetteurs.

La spécificité de la chaîne lourde de la TeNT pour les neurones et son intéressante propension au passage trans-synaptique rétrograde se sont révélées utiles pour tracer des circuits neuronaux dans le cerveau. Ainsi, injectée à des souris au niveau de la langue, la protéine TTC est détectée 12h après le long du nerf moteur hypoglosse, puis 24 à 48h plus tard dans de nombreux noyaux du SNC (Coen *et al.*, 1997). Couplée à la GFP (*Green fluorescent protein*), la TTC s'est révélée être un formidable

outil pour suivre le trajet des neurones connectés synaptiquement entre eux (Bordet et al., 2001; Maskos et al., 2002). Pourtant, cette application est dépourvue d'explication puisqu'aucune information précise n'est disponible sur le mécanisme moléculaire utilisée par la toxine pour passer de neurone à neurone.

A l'heure actuelle, le passage de la TeNT entre les motoneurones et les interneurones dans la moelle épinière reste obscur. Or, la présence de cette toxine dans les MVE, sa colocalisation avec Rab7 et les radeaux lipidiques ont conduit notre laboratoire à l'hypothèse que la TeNT pourrait être sécrétée via les exosomes au niveau du neurone moteur, ce qui lui permettrait d'être ensuite transférée aux interneurones.

Objectifs de la thèse

L'existence des exosomes a été révélée il y a bientôt 30 ans. Depuis, il a été montré dans différents types cellulaires que ces vésicules permettent l'échange de protéines et d'ARN fonctionnels entre les cellules. L'équipe « Neurodégénérescence et Plasticité » dans laquelle j'ai effectué mon doctorat travaille depuis plusieurs années à démontrer le rôle des exosomes dans la communication intercellulaire au sein du SNC et plus particulièrement entre les neurones. Mes travaux de thèse s'inscrivent dans cette démarche.

L'équipe a découvert que les neurones sécrétaient des exosomes. En les purifiant à partir de cultures primaires de neurones corticaux jeunes, elle en a étudié les caractéristiques morphologiques, densitométriques et protéomiques.

Au cours de ma thèse, nous avons dans un premier temps examiné si la sécrétion des exosomes pouvait être régulée par l'activité neuronale. Cette première partie a nécessité la purification d'exosomes de neurones matures, sécrétés pendant des temps très courts en fonction des différents agonistes et antagonistes appliqués sur les cultures. Nous avons par ailleurs prouvé l'origine endosomale des exosomes neuronaux par l'utilisation de la partie C-terminale de la toxine du tétanos couplée à la GFP (GFP-TTC). Ces travaux, menés par Gaëlle Lachenal, ont été valorisés dans une publication du laboratoire dans laquelle j'apparais en troisième auteur (appendix : article 1 ([Lachenal et al., 2011](#))).

Dans un second temps, mon travail de thèse a porté sur le devenir des exosomes neuronaux une fois sécrétés. Nous avons développé différents outils permettant de suivre les exosomes en microscopie confocale à fluorescence et leur passage entre les neurones. Nous avons notamment travaillé avec la GFP-TTC.

Enfin, nous nous sommes intéressé au contenu en ARN des exosomes neuronaux et leur modalité d'action sur les cellules cibles. Pour cela, nous avons réalisé des études transcriptomiques en collaboration avec différents laboratoires et avons commencé à développer un système cellulaire permettant de démontrer l'activité biologique des ARN exosomaux dans les cellules receveuses.

Matériel et méthodes

I. Culture cellulaire

1. Culture lignée

Les N2a sont des cellules de neuroblastomes de souris. Cette lignée est cultivée dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) additionné de 10% de sérum de veau fœtal inactivé (SVF, Gibco), de 2mM de L-glutamine et des antibiotiques : 10µg/mL de streptomycine, 10U/mL de pénicilline. Sur des cellules arrivées à confluence dans une boîte de Pétri, deux rinçages au PBS (Phosphate Buffer Saline) sont effectués, puis les cellules sont trypsinisées (trypsine-EDTA 0,25%) pendant 2 minutes à 37°C. Pour la maintenance des cellules, elles sont divisées au 1/6^{ème} et passées deux fois par semaine.

2. Obtention d'une lignée exprimant constitutivement GFP-CD63

Les N2a ont été transfectées avec un plasmide codant pour la tétraspanine CD63 couplée à la GFP à son extrémité N-terminale. Ce plasmide contenait également le gène *nptII* codant pour l'aminoglycoside 3'-phosphotransférase qui, par phosphorylation, inactive de nombreux antibiotiques comme la kanamycine, la néomycine ou encore la généticine (G418). Par incubation des cellules transfectées avec du G418 à 0,4 mg/mL (Gibco), seules les cellules exprimant le gène *nptII* (et donc notre protéine d'intérêt) survivent. L'application de cette pression de sélection pendant quelques passages en culture permet de détecter les cellules transfectées de façon stable (résistantes). En utilisant la technique de dilution limite, des clones ont été isolés sur plaque 96 puits. Après analyse en Western blot et immunofluorescence, le clone 3 a été choisi comme lignée stable exprimant la GFP-CD63.

3. Culture primaire

Toutes les procédures sur animaux ont été réalisées selon les recommandations françaises sur l'utilisation d'êtres vivants dans des expérimentations scientifiques avec l'aval du comité d'éthique du GIN. A 18 jours de gestation, une rate OFA (Charles River) est anesthésiée par inhalation d'isoflurane (Baxter) puis décapitée. L'utérus puis les poches amniotiques contenant les embryons (E18) sont extraits. Les embryons sont à leur tour décapités et leurs cerveaux prélevés.

Toute la dissection se déroule dans du PBS glucosé préchauffé à 37°C. Il est constitué de 5 mM glucose, 10 mM Hépès, 136 mM NaCl, 5 mM KCl, 440 µM KH₂HPO₄, 270 µM Na₂HPO₄, 10µg/mL de streptomycine, 10U/mL de pénicilline, pH 7,4.

Sous une loupe binoculaire, les hémisphères cérébraux sont séparés puis les méninges soigneusement enlevées ; les cortex et les hippocampes sont prélevés et placés dans du PBS glucosé chaud. Après dissection, les hippocampes et les cortex sont mis séparément en présence de trypsine-EDTA (0,25%, Gibco) supplémentée de 15 mM Hépès et 33 mM glucose pendant 15 min à 37°C (dissociation chimique). Ils sont ensuite lavés dans du PBS glucosé chaud puis placés trois minutes à 37°C dans de l'inhibiteur de trypsine (2mg/mL, Sigma) et de la DNase (150 U/mL, Sigma). Ils sont alors rincés deux fois dans du PBS glucosé chaud avant de subir une dissociation mécanique par trituration avec une pipette 1000 µL portant un cône à filtre. La suspension cellulaire de neurones corticaux est ensuite passée à travers une passoire cellulaire (diamètre 70 µm, BD Falcon). Les neurones vivants sont comptés sur une lame de Malassez avec 0,04% de bleu de Trypan et ensemencés dans des boîtes de culture préalablement recouvertes de poly-D-lysine (Sigma) diluée à 50 µg/mL dans du tampon Borate (0,31% Acide Borique ; 0,47% Disodium Tétraborate dans H₂O, pH 8,5). Les neurones corticaux sont semés à une densité moyenne de 45 000 neurones/cm² ; les neurones hippocampiques, eux, sont ensemencés à la densité de 12 000 neurones/cm².

Le milieu d'ensemencement est constitué de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) complété par du sérum de cheval inactivé (10%, Gibco). Il est remplacé deux heures plus tard par du milieu Neurobasal (Gibco) complété par : du B27 (2%, Gibco), 1mM de sodium pyruvate, 2mM de L-glutamine et des antibiotiques (10µg/mL de streptomycine, 10U/mL de pénicilline). Les boîtes de culture sont placées à l'étuve (37°C, 5% de CO₂). Au quatrième jour de culture, 25% de milieu frais supplémenté de 5 µM de cytosine-bêta-D-arabinoase (AraC, Sigma) est ajouté. L'AraC est un antagoniste pyrimidique qui permet de limiter la prolifération des cellules gliales présentes dans la culture. Par la suite, les neurones sont nourris toutes les semaines et cultivés jusqu'à leur utilisation (J15, J22).

Lorsque les neurones sont ensemencés sur des lamelles de verre (Marienfeld, n°0111540, D : 14 mm), celles-ci sont préalablement traitées 72h à l'acide nitrique (70%, Sigma) pour devenir hydrophiles puis rincées abondamment à l'eau distillée stérile (Gibco).

4. Transfection

Transfection des lignées cellulaires au JetPEI

Lorsque les N2a sont confluentes à 50-70%, elles sont transfectées transitoirement à l'aide de JetPEI (Polyplus transfection) avec un plasmide codant pour la protéine d'intérêt. L'ADN et le JetPEI sont dilués séparément dans une solution de NaCl 150 mM puis mélangés (la solution contenant le JetPEI dans celle contenant l'ADN) et incubés à température ambiante pendant 25 minutes. Le mélange ADN-JetPEI est ensuite déposé goutte à goutte sur les cellules qui sont replacées à l'étuve (37°C, 5%

de CO₂). Pour une boîte de 100 mm de diamètre, 600 µL de NaCl 150 mM (2X300), 18µL de JetPEI et 3 µg d'ADN sont utilisés. Pour la transfection du pré-miR 138, le plasmide a été acheté auprès d'Addgene <http://www.addgene.org/26328/>.

Transfection des neurones d'hippocampe à la lipofectamine

Les neurones sont transfectés à l'aide de la Lipofectamine LTX (Invitrogen). Pour une boîte 35 mm, 3 µg d'ADN plasmidique au maximum sont utilisés. Pour cela, le milieu de culture des neurones est récupéré et conservé à 37°C, les neurones sont alors placés dans un milieu transitoire, dit de transfection, dont la composition est la suivante : 1X MEM -contenant 40mM glucose- (Gibco), 1 mM sodium pyruvate, 15 mM Hépès, 2 mM L-glutamine, 1 mM acide kynurénique, 10 mM MgCl₂. Ils sont incubés dans ce milieu à 37°C sans CO₂. Au bout d'une heure, le milieu de transfection est remplacé par l'ancien milieu de culture.

5. Coloration au WGA

Le WGA (wheat germ agglutinin) conjugué à un fluorochrome se fixe spécifiquement aux résidus des acides sialiques, permettant de colorer les membranes cellulaires. Avant ou après incubation des exosomes, les neurones receveurs sont mis en présence de WGA-Alexa Fluor 594 conjugué (Invitrogen) soit pendant 10 minutes à 37°C soit pendant 2min à 4°C à la concentration de 5µg/mL. La coloration, extrêmement rapide, est suivie de deux lavages en milieu basal K5. L'incubation du WGA à 37°C permet son internalisation progressive tandis qu'à 4°C, il colore exclusivement la membrane plasmique.

II. Purification des exosomes

1. Centrifugations différentielles

Les exosomes de N2a sont récoltés à partir de surnageants de culture pour lesquels les cellules ont été lavées deux fois en PBS et placées dans un milieu complet dont le sérum (SVF) a été préalablement ultracentrifugé pendant 18h (milieu « exosome-free »). Les surnageants de N2a sont récupérés au bout de 16h ou 24h. Les exosomes neuronaux sont purifiés à partir de culture primaire de neurones corticaux de rat à 15 jours de vie *in vitro* (15 DIV). Le milieu de culture est d'abord aspiré puis les neurones sont lavés deux fois avec une solution ionique nommée K5 et dont la composition est la suivante : 1,8 mM CaCl₂.2H₂O, 0,8 mM MgSO₄.7H₂O, 110 mM NaCl, 26 mM NaHCO₃, 1mM NaHPO₄.2H₂O, 0.7% D-Glucose, 15 mM Hépès et 5 mM KCl. La sécrétion des exosomes est ensuite stimulée. Les neurones sont par exemple incubés à 37°C pendant 15 min avec du K5 contenant 40 µM de bicuculline (Sigma) et 100 µM de 4-Aminopyridine (4-AP, Sigma).

Les surnageants sont collectés et traités avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases 25X (Protease inhibitor cocktail tablets cOMplete EDTA, Roche). Dans le cas d'une purification pour extraction d'ARN exosomaux, les surnageants sont placés 10 minutes à 37°C avec de la RNase A à une concentration finale de 0,04 µg/µL (RNase A stock 10 mg/mL, Euromedex).

Toutes les étapes de ce protocole de purification d'exosomes s'effectuent à 4°C.

Les surnageants subissent une première centrifugation de 10 min à 2000 g afin d'éliminer les cellules mortes et les gros débris cellulaires (Multifuge 3_{S-R}, Heraeus). Le culot n'est pas conservé et les surnageants sont soumis à une nouvelle centrifugation, de 20 minutes à 20 000 g (RC 6 Plus, Sorvall). Les surnageants sont récupérés et filtrés à travers un filtre 0,22 µm dans le but de se débarrasser des derniers micros-débris (Millex GV en PVDF, Millipore). Une fois filtrés, les surnageants sont ultracentrifugés 2h à 100 000 g (rotor SW41 ou SW32, Optima L-90K ultracentrifuge, Beckman-Coulter). Après élimination des surnageants, le culot de vésicules extracellulaires peut être repris :

- dans du tampon Laemmli 1X (625mM Tris HCL pH 6.8, 10% SDS, 50% glycérol, 12.5% β-mercaptoéthanol, 5mg/mL de bleu de bromophenol) en vue d'une analyse en Western blot ;
- dans 350 µL de Qiazol (QIAzol Lysis Reagent, Qiagen) en vue d'une extraction d'ARN ;
- dans 0.211 M de sucrose (dissout dans du tampon Imidazole 3 mM pH 7,4) pour un fractionnement sur gradient de sucrose.

2. Fractionnement des exosomes sur gradient de sucrose

Il s'agit d'un gradient continu de sucrose 0,3 M - 1,4 M (dans du tampon Imidazole 3 mM pH 7,4) coulé dans un tube Ultraclear Beckman SW41. Le culot 100 000 est déposé à la surface du gradient mais pas dans sa totalité : 5 ou 10% sont prélevés pour être par la suite analysés en Western blot en tant qu'*Input*.

Le gradient est ultracentrifugé à 100 000 g pendant 18h (Optima L-90K ultracentrifuge, Beckman-Coulter). Dix fractions de 1 mL sont ensuite récupérées, placées dans des tubes Beckman SW41 en polyallomère et vortexées. 10 µL de chaque fraction sont alors prélevés pour dépôt sur un réfractomètre afin de vérifier leur densité de sucrose (Euromex, microscopes, Holland). Les fractions sont par la suite diluées dans 10 mL d'Imidazole 3 mM pH 7,4 ; eau RNase free (Gibco) puis ultracentrifugées 2h à 200 000g (rotor SW41, Optima L-90K ultracentrifuge, Beckman-Coulter). Le culot obtenu est repris dans 40 µL de tampon Laemmli pour être ensuite analysé en Western blot ou dans 175 µL de Qiazol, il est alors transféré dans un Eppendorf Safe Lock Biopur et congelé dans l'azote liquide (puis conservé à -80°C avant extraction).

Pour l'extraction d'ARN, les surnageants de deux cultures de neurones corticaux (par exemple, deux fois 30 boîtes 100 mm soit 30 x 2,6 millions de neurones) sont récupérés et deux gradients de sucrose sont réalisés. Les fractions sont additionnées 2 à 2 pour un volume final de 350 µL de Qiazol.

III. Lysats cellulaires

En parallèle de la récolte des surnageants, les lysats cellulaires sont repris dans du tampon de lyse RIPA (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0,1% SDS, 0,5% Na-deoxycholate). Après centrifugation (15 min à 16 000 g à 4°C) pour culotter l'ADN, la concentration en protéines est estimée par dosage BCA (bicinchoninic acid assay, Pierce, Thermo Scientific). Lorsque les lysats de neurones sont analysés en Western blot pour détecter les ERK1/2 phosphorylées, les lysats sont soniqués. Un certain volume de lysats est repris dans du tampon Laemmli de sorte que 10 ou 20 µg de protéines soient déposés sur SDS-PAGE. Dans le cas d'une extraction d'ARN, les cellules sont lysées dans 350 µL de Qiazol en vue d'une extraction d'ARN.

IV. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS PAGE)

Les échantillons d'exosomes et de lysats repris dans du tampon Laemmli sont bouillis 5 minutes puis déposés sur un gel de polyacrylamide (10% SDS PAGE). La migration s'effectue à 90 puis 130V dans un tampon de migration dénaturant composé de 250 mM Tris, 192 mM glycine, 0,01% SDS (p/v). Les protéines sont ensuite électrotransférées sur une membrane de polyvinylidène fluoride (PVDF, Millipore immobilon P) préalablement hydratée 1 minute dans de l'isopropanol puis dans le tampon de transfert. Le transfert se déroule pendant 1h30 à 500mA (20 V) à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec (Trans-blot SD, Biorad) dans un tampon contenant 3g/L Tris HCl, 14,4g/L Glycine, 0,4g/L SDS, isopropanol 10%. La membrane de PVDF est ensuite lavée à l'eau puis saturée par une incubation dans du lait écrémé (Régilait) dilué à 5% (p/v) dans du TBS (Tris Buffer Saline, 20 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,8% NaCl p/v) – Tween20, 0,1% (TBS-T) pendant 1h à température ambiante et sous agitation.

V. Western blot

L'anticorps primaire (dilué dans du TBS-T 5% lait) est incubé toute la nuit à 4°C, sous agitation. Après 3 lavages de 10 minutes au TBS-T, l'anticorps secondaire couplé à la Horseradish Peroxydase (HRP, Jackson Immunoresearch Laboratories) est incubé 1h à température ambiante. Six rinçages de 5 minutes sont réalisés au TBS-T. La détection du complexe protéine-anticorps I-anticorps II est réalisée

grâce au kit de détection ECL (*Enhance Chemiluminescent kit*, Millipore). Le signal luminescent est ensuite révélé sur film photographique (Hyperfilm-ECL, GE Healthcare).

VI. Immunofluorescence

Deux protocoles sont utilisés selon le type de marquage souhaité : marquage des compartiments synaptiques ; marquage des compartiments de la voie endocytaire.

1. Immunofluorescence des compartiments synaptiques

Les neurones sont fixés en PFA 4% (paraformaldéhyde) sucrose 4%. Les lamelles sont ensuite lavées en PBS et la perméabilisation des cellules s'effectue en PBS Triton X100 0,1% pendant 10 minutes à 4°C. Après lavages en PBS, le blocage est effectué en PBS-GPI 3% (Goat Pro Immune) pendant 35 minutes à température ambiante (RT). Les anticorps primaires et secondaires sont dilués dans du PBS-GPI 3% et incubés sur les lamelles pendant 1h à RT. Les lamelles sont lavées soigneusement en PBS puis rincées à l'eau distillée avant d'être montées sur lame dans du Mowiol DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole, Calbiochem).

2. Immunofluorescence des compartiments de la voie endocytaire

Les neurones sont fixés en PFA 4% sucrose 4%, lavés en PBS. La perméabilisation et le blocage sont réalisés dans du TBSS (TBS 1X, saponine 0,05%), GPI 3% 35 min à RT. Pour l'immunodétection, les différents anticorps primaires et secondaires sont dilués dans du TBS-GPI 1% incubés pendant 1h à RT. Les lamelles sont lavées en TBS puis rincées à l'eau distillée. Le montage des lamelles sur lames est effectué comme décrit plus haut.

VII. Anticorps

Anticorps primaire	Espèce	Fournisseur	Référence produit	Concentration (ou à défaut dilution) d'utilisation	Usage
Anti Alix	lapin	Covalab	pab0204	1/3000	Wb (91-93 kDa)
Anti CD63	souris	BD Pharmingen	556019	5 µg/mL	Wb (smire autour de 45-55 kDa)
Anti EEA1	souris	BD Transduction Lab.	610457	0,1 µg/mL	IF

Anti Flotilline-1	souris	BD Transduction Lab	610820	250 ng/ml	Wb (48 kDa)
Anti GFP	souris	Covance	MMS-118R	0,4 µg/ml	Wb (26 kDa)
Anti GFAP	souris	Cell signaling	#3670	1/200	IF
Anti Lamp1	lapin	Abcam	Ab24170	2,5 µg/mL	IF
Anti LBPA	souris	Donné par J. Gruenberg, Univ. de Genève	6C4	1/100	IF
Anti L1-CAM	lapin	Donné par F. Rathjen (Max-Delbrück centrum)	/	1/1000	Wb (180-220 kDa)
Anti Erk1/2-P	lapin	Cell Signaling	#4370	1/2000	Wb (42, 44 kDa)
Anti Erk1/2	souris	Cell Signaling	#9102	1/2000	Wb (42, 44 kDa)
Anti PSD95	souris	Abcam	ab2723	1/100	IF
Anti Synaptobrevine 2/VAMP2	souris	Synaptic System	104211	0,01 à 0,1 µg/ml	Wb 11-13 (ne reconnaît pas les fragments de clivage)
Anti Synaptophysine	souris	Sigma	S 5768	1/200	IF
Anti Tetanus Toxin	lapin	Abcam	ab53829	1mg/ml	Wb, chaîne lourde :100 kDa chaîne légère :50 kDa
Anti Tsg101	souris	Abcam	ab83	1 µg/ml	Wb, 45 kDa
Anti VAMP1,2,3	lapin	Synaptic System	104203	1 µg/ml	Wb, 11 à 13 kDa, et fragments de clivage
Anti transferrine receptor	souris	Zymed	13-6800	2,5 µg/mL	IF

Les anticorps secondaires employés en Western blot sont les suivants : anticorps de chèvre anti-souris ou anti-lapin couplés à la HRP (*Jackson ImmunoResearch*, 1/10 000) ; en immunofluorescence sont utilisés des anticorps de chèvre anti-souris ou anti-lapin couplés à l’Alexa 488 ou l’Alexa 594 ou encore la Cyanine 5 (*Jackson ImmunoResearch*, 1/500).

VIII. Stimulation des cultures primaires

1. Milieux basal et dépolarisant

Les milieux sont préparés fraîchement à partir de solutions-stock de chaque ion dilué dans de l’eau stérile. Les milieux de lavages K5 et de stimulation K25/K50 sont des solutions aqueuses contenant respectivement 5 mM et 25 mM/50 mM de KCl. Leur composition est donnée dans le tableau suivant :

Solution	K5	K25	K50
CaCl ₂ .2 H ₂ O	1,8mM	1,8mM	1,8mM
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,8mM	0,8mM	0,8mM
NaCl	110mM	90mM	65mM
NaHCO ₃	26mM	26mM	26mM
Na ₂ HPO ₄ .2 H ₂ O	1mM	1mM	1mM
D-Glucose	40mM	40mM	40mM
Hépès pH 7.3	15mM	15mM	15mM
KCl	5mM	25mM	50mM

2. Agents chimiques utilisés sur les neurones

Le tableau ci-dessous indique les concentrations d'utilisation de chaque molécule, ainsi que le fournisseur :

Produit	Concentration d'utilisation	Fournisseur
CNQX	100 μ M	Sigma
MK801	1 μ M	Sigma
Bicuculline	40 μ M	Fluka, Sigma
Ionomycine	2 μ M	Sigma
BAPTA-AM	50 μ M	Sigma
4-Aminopyridine	100 μ M	Sigma
TTX	0,5 μ M	Tocris

3. Protocoles de stimulation

Les neurones corticaux sont stimulés à 15 DIV, les neurones d'hippocampe à 21 DIV. Tous les milieux (contrôle, dépolarisation et contenant les agonistes/antagonistes) sont préparés au dernier moment, et préchauffés à 37°C. Le milieu de culture est aspiré et les neurones sont lavés 2 fois en K5. Ensuite, le milieu de dépolarisation ou contenant les agonistes/antagonistes est incubé sur les neurones pendant le temps désiré, à l'étuve. Les milieux sont ensuite récoltés et mis sur la glace en attendant d'appliquer le protocole de purification des exosomes. Les cellules sont directement lysées dans du RIPA, à 4°C.

IX. Extraction d'ARN

1. Extraction d'ARN totaux

L'extraction des ARN totaux est effectuée à l'aide du couplage de deux kits Qiagen : le *miRNeasy Mini Kit* (spécialement conçu pour les microARN) et le *RNeasy micro kit* (adapté aux petites quantités grâce à ses petites colonnes) d'après un protocole établi avec l'aide de Catherine Rey (plateforme profilXpert, Lyon). Le principe de ce protocole repose sur la fixation des ARN à une colonne de silice associée à plusieurs étapes de lavages/centrifugations. Les échantillons (lysats cellulaires et exosomes) sont repris et homogénéisés dans du tampon de lyse Qiazol, qui contient, entre autres, du

phénol (extraction organique) et du thiocyanate de guanidine (disruption chaotropique) dans un volume final de 350 μ L. On y ajoute 70 μ L de chloroforme (vortex), et après avoir laissé pauser 3 min à température ambiante (RT), les tubes sont centrifugés 12 000 g 15 min à 4°C pour permettre la séparation des phases. La phase aqueuse, qui contient les ARN, est délicatement reprise et placée dans un nouveau tube. On y ajoute 263 μ L d'éthanol pur. Le mélange est déposé sur la colonne *RNeasy Mini spin column* et centrifugé à 10 000 g 15 s à RT. L'éluant est jeté, on ajoute 700 μ L de tampon RWT *ethanol added* (tampon de lavage) à la colonne à laquelle on fait subir une nouvelle centrifugation à 10 000 g 15 s à RT. L'éluant est jeté et 500 μ L de tampon RPE sont ajoutés à la colonne. Une nouvelle centrifugation est effectuée à 10 000 g 15 s à RT, l'éluant n'est pas conservé. On ajoute alors 500 μ L d'éthanol 80% à la colonne. Le séchage de celle-ci est effectué grâce à une centrifugation de 2 min à 10 000 g à RT. L'éluant et le tube collecteur sont jetés, le tube collecteur est remplacé par un tube neuf. On effectue ensuite une centrifugation à 14 000 g 5 min à RT (tube ouvert). Pour les échantillons exosomaux, l'ARN est élué dans 15 μ L d'eau RNase free (Qiagen). Pour les échantillons cellulaires, l'ARN est élué dans 30 μ L d'eau RNase free.

2. Extraction d'ARN courts

Elle est réalisée grâce au kit Qiagen *miRNeasy mini kit* en suivant l'appendix concernant les ARN de petite taille (microARN et ARN < 200 nt). Les ARN sont isolés à partir de lysats cellulaires et d'exosomes. Brièvement, les échantillons sont homogénéisés dans du Qiazol. Après ajout de chloroforme, les phases organique et aqueuse sont séparées par centrifugation. Les ARN se situent dans la phase aqueuse tandis que les protéines se concentrent dans la phase organique. Une fois la phase aqueuse récupérée, de l'éthanol est ajouté pour améliorer la fixation des ARN à la colonne de silice (*RNeasy Mini spin column*). Par la suite, l'utilisation d'une autre colonne (*RNeasy MinElute*) permet de se débarrasser des ARN longs et de ne conserver que les ARN courts. Ces derniers sont finalement élués dans 15 μ L d'eau RNase-free (Qiagen).

3. Analyse des ARN

1 μ L de l'éluat obtenu en fin d'extraction est passé au Nanodrop (Thermoscientific) pour en estimer la qualité et la concentration. Les ARN sont ensuite déposés sur picopuce Agilent et analysés à l'aide du Bioanalyser Agilent 2100 (Agilent technologies). L'analyse sur plaques TLDA (TaqMan Low Density Array, life technologies) des microARN présents dans les N2a et leurs exosomes a été réalisée sur la plateforme ProfilXpert (C. Rey, J. Lachuer).

X. RT-q-PCR

La RT-q-PCR se décompose en deux étapes : une première étape de RT (*Reverse Transcription*) ou transcription inverse, puis une seconde étape de q-PCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*). La première étape est effectuée dans un thermocycleur *Biolab scientific instrument* (Biometra), la seconde avec l'appareil *Stratagene Agilent Mx 3005p system* (Agilent technologies).

1. Transcription inverse

Le kit *TaqMan Individual Assay* (life technologies) pour microARN est utilisé pour réaliser la RT. L'originalité de la technique consiste à utiliser une amorce d'oligonucléotide d'un type particulier, qui, contrairement à une amorce ordinaire, est en forme de boucle. Cette propriété de l'amorce permet une transcription inverse spécifique des microARN matures. Le pré-microARN étant plus grand en extrémité 3' que le microARN mature, l'hybridation de la partie complémentaire du *primer* avec le pré-microARN ne peut pas avoir lieu. Des amorces spécifiques sont utilisées respectivement pour le microARN 138 et pour le microARN132.

Les éléments du milieu réactionnel nécessaires à la synthèse de l'ADNc sont : la reverse transcriptase et sa solution tampon, les amorces spécifiques, les 4 dNTP, et afin d'éviter toute dégradation de l'ARN avant ou durant la RT, un inhibiteur de RNase (RNasin, Promega). Les réactions de RT sont réalisées en triplicat et des contrôles négatifs sont aussi réalisés pour chaque échantillon en omettant la reverse transcriptase, ce qui permet de vérifier que les amplifications observées en qPCR ne soient pas des amplifications d'ADN génomique résiduel.

2. q-PCR

La q-PCR est réalisée avec le kit *Taqman Universal Master Mix II* (life technologies). Le milieu réactionnel contient l'enzyme, les dNTP, les amorces, les sondes TaqMan et les produits de la RT. L'enzyme utilisée est une ADN polymérase Hot Start, l'amplification ne peut débuter que lorsque le programme de PCR commence. De plus, les amorces et les sondes sont spécifiques à un microARN. Les réactions sont réalisées en triplicat et plusieurs contrôles sont effectués à chaque expérience : des contrôles négatifs sans échantillon pour chaque paire d'oligonucléotides testée, et les contrôles RT Ø évoqués ci-dessus pour s'assurer de l'absence d'ADN génomique. L'analyse de l'expression génique est faite selon la méthode des $\Delta\Delta CT$ (H. Ipas, plateforme transcriptomique du GIN, équipe Nanosciences et cerveau).

XI. GFP-TTC et TTC-HRP

1. Production

GFP-TTC

Pour 1L de bactéries BL-21 transformées avec le plasmide pGEX contenant la construction GST-GFP-TTC, l'induction est déclenchée par l'ajout de 40µM d'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) à 28°C pendant 4h. Les bactéries sont culottées et resuspendues dans du PBS-NaCl 0,5M, puis lysées avec du lysosyme (1 mg/ml). Pour améliorer la lyse, on laisse agir un mélange Triton X-100 1%, NP-40 1%, DNase (10µg/ml), MgCl₂ 2,5mM, 2h à température ambiante. Les bactéries sont ensuite soniquées plusieurs fois pendant 10 minutes. Le lysat est centrifugé à 48 000 g pendant 20 min, à 4°C. Le surnageant est passé dans une colonne G-sépharose (Glutathion-sépharose 4B, Amersham Biosciences). Les billes sont lavées au PBS-NaCl 0,5M puis l'élution est réalisée en présence de glutathion 5mM –Tris 50mM pH 8.3 -NaCl 0,5M. L'éluat est ensuite dialysé contre un grand volume de PBS-NaCl 0,5M-Glycérol 5%. Enfin, une étape d'ultracentrifugation (100 000 g, 1h) permet d'enlever les agrégats. Nous avons également réalisé une production de GST-GFP dans les mêmes conditions.

TTC-HRP

La première étape consiste en la production de GST-TTC (comme GST-GFP-TTC) suivie d'un clivage protéolytique par la *prescission protease* entraînant la libération de TTC. Puis, le couplage de TTC à la HRP est réalisé avec le kit EZ-Link Plus Activated Peroxidase (Thermo Scientific, réf. 31489). Celui-ci s'effectue en tampon bicarbonate pH 9,4 (1TTC/1 HRP). S'en suit un passage sur microcon 50 kd dans le but d'éliminer la HRP non couplée. Une dialyse en PBS est par la suite effectuée. Une solution de TTC-HRP est ainsi obtenue à la concentration de 6µg/µl. Enfin, une étape d'ultracentrifugation pendant 1h à 100 000 g est réalisée pour enlever les agrégats.

2. Incubation sur les neurones

- Protocole employé dans l'article 1 :

La GFP-TTC (ou la GFP) est incubée sur les neurones (à la concentration finale de 36 nM) dans le milieu de culture pendant 2h. Après des lavages extensifs en milieu basal contenant 5 mM de KCl (appelé K5), la stimulation des exosomes est effectuée soit par dépolarisation des neurones pendant 3h en K25 (milieu basal contenant 25 mM de KCl) soit par incubation pendant 15 min avec du K5 contenant 40 µM de bicuculline (Sigma) et 100 µM de 4-Aminopyridine (4-AP, Sigma).

- Protocole en 4 étapes utilisé par la suite :

1. Incubation de la GFP-TTC pendant 2h à la concentration finale de 36 nM suivie de lavages extensifs en milieu basal contenant 5 mM de KCl (K5).
2. Stimulation de l'endocytose de la GFP-TTC par incubation des neurones pendant 5-10 min dans une solution dépolarisante contenant 50 mM de KCl (K50).
3. Les neurones sont replacés dans un milieu basal K5 pour une chasse de 2 heures.
4. Stimulation de la sortie des exosomes en K5 + 40 μ M de bicuculline + 100 μ M de 4-AP.

XII. Incubation d'exosomes sur neurones d'hippocampe

1. Exosomes de N2a

Les N2a GFP-CD63 (lignée clonale) sont lavées deux fois en PBS puis placées dans du milieu complet dont le sérum (SVF) a été préalablement ultracentrifugé pendant 18h à 100 000 g pour le débarrasser des exosomes sériques (obtention d'un sérum « *exosome-free* »). Les surnageants sont récupérés au bout de 16h ou 24h de sécrétion. Ils sont centrifugés, filtrés et culottés à 100 000 g. Le culot 100 000 g est alors repris dans du milieu conditionné provenant des cultures des neurones hippocampiques receveurs. Cette suspension exosomale est incubée sur les neurones cultivés sur lamelles dans un volume d'environ 200 μ L par lamelle (diamètre 14 mm). Les lamelles ainsi incubées sont placées dans une chambre humide à l'étuve (37°C, 5% de CO₂) pendant un temps déterminé. Chaque lamelle est incubée avec une quantité d'exosomes correspondant à la sécrétion d'environ 20 millions de cellules N2a GFP-CD63. Après plusieurs lavages en K5, les neurones sont fixés en 4% PFA - 4% sucrose.

2. Exosomes neuronaux

A l'issue de l'étape de stimulation de la sécrétion, les surnageants des neurones corticaux préalablement incubés avec la GFP-TTC ont été récoltés. Après avoir subi plusieurs centrifugations différentielles, le culot 100 000 a été déposé sur un gradient continu de sucrose 8-60%. A l'issue de l'ultracentrifugation du gradient pendant 18h, sont récupérées 10 fractions de 1mL. Chaque fraction est divisée en deux : une partie pour le Western blot ultérieur et l'autre pour l'étape d'incubation des exosomes sur neurones receveurs. Après vérification de la densité de sucrose d'un extrait (10 μ L) de chacune des fractions destinées à l'incubation, les trois fractions correspondant à la densité de sédimentation des exosomes, soit $\pm 1,13$ g/mL de sucrose, sont conservées (réfractomètre Euromex, microscopes, Holland). Il s'agit la plupart du temps des fractions 4, 5 et 6. Elles sont alors diluées dans 10 mL d'Imidazole 3 mM pH 7,4 puis ultracentrifugées 2h à 200 000g (rotor SW41, Optima L-90K ultracentrifuge, Beckman-Coulter). Le culot obtenu est repris dans du milieu conditionné provenant

des cultures des neurones hippocampiques receveurs. Cette suspension exosomale est incubée sur les neurones dans un volume d'environ 200 µL par lamelle (diamètre 14 mm). Chaque lamelle est incubée avec une quantité d'exosomes correspondant à la sécrétion d'environ 6,5 millions de neurones corticaux. Les lamelles ainsi recouvertes sont placées en chambre humide pendant un temps donné à l'étuve (37°C, 5% de CO₂). Après plusieurs lavages en K5, les neurones sont fixés en 4% PFA - 4% sucrose.

3. Observation en microscopie à fluorescence

Les lamelles sont observées au microscope à fluorescence Axiovert 200 M, Zeiss ; au microscope confocal LAS AF – TCS SPE, Leica ou au microscope confocal LSM 700 (Zeiss) piloté par le logiciel Zen. Les images sont traitées sous *imageJ*.

XIII. Microscopie électronique

Le microscope utilisé pour toutes les observations est un microscope électronique à transmission Jeol JEM 1200EX. Les grilles (Gilder Grids Copper/paladium, Euromedex) sont lavées dans de l'éthanol 100% puis placées sur un film de Formvar 2% (préparé dans du chloroforme). Après séchage, elles sont carbonées puis conservées à l'abri de la poussière.

1. Préparation du culot d'exosomes

Les exosomes sont culottés à 100 000 g pendant 2h. Le culot 100 000 g est repris dans de la PFA 2% (diluée dans du PBS). Une goutte de 4µl de l'échantillon est déposée sur une grille carbonée, et incubée à température ambiante pendant 20 minutes. Le surplus d'échantillon est retiré en passant la grille sur un papier buvard (Wattman).

2. Immunogold sur culot d'exosomes

Après l'étape d'incubation avec l'échantillon, les étapes suivantes sont effectuées en posant les grilles sur des gouttes. Les grilles sont rincées dans un mélange PBS-Glycine 50mM pendant 10 min puis passées dans une solution de PBS-BSA 10mg/mL pendant 10 min. Pour détecter la GFP située au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine de fusion GFP-CD63 et donc par conséquent localisée à l'intérieur de la lumière exosomale, les grilles sont passées dans une solution de PBS-BSA 10mg/mL + 0,05% saponine pendant 20 minutes (perméabilisation). L'anticorps primaire est dilué dans le PBS-BSA 10mg/mL 1h à température ambiante : Anti GFP (souris) au 1/200 ou anti CD63 (souris) au 1/100. S'en suivent des lavages en PBS-BSA 1 mg/mL (3 x 3 min) puis une étape d'incubation avec un anticorps de pontage (lapin anti souris) au 1/200 pendant 30 min car il faut des

motifs antigéniques « lapin » pour la suite. Des lavages en PBS-BSA 1 mg/mL (3 x 3 min) sont à nouveau effectués. Par la suite,

- Pour la GFP (située à l'intérieur des exosomes GFP-CD63) :

Incubation en PBS-BSA 10mg/mL avec 1/100 Fab 1,4nm (Nanoprobe) pendant 1h suivie de 3 lavages de 3 min en tampon phosphate 0,1 M (tampon phosphate, solution mère 0,5M, pH 7,4 : 8,1 vol. de Na_2HPO_4 0,5M ; 1,9 vol. de NaH_2PO_4 0,5M). Les grilles sont ensuite fixées en glutaraldéhyde 1% dilué dans du tampon phosphate 0,1 M, 5 minutes. Puis, elles sont lavées 8 fois dans de l'eau distillée (8 x 2 min), incubées avec le kit HQ silver enhancement (Nanoprobe kit) 6 min à l'obscurité et enfin lavées 7 fois 2 min dans de l'eau distillée.

- Pour CD63 (à l'extérieur) :

Incubation avec le complexe Protéine A-bille d'or (10 nm) dilué au 1/70 dans du PBS-BSA 10mg/mL pendant 30 min. Deux lavages au PBS sont ensuite réalisés (2 x 3 minutes), puis deux autres dans du tampon phosphate 0,1M (2 x 3 min). Les grilles sont fixées en glutaraldéhyde 1% dilué dans du tampon phosphate 0,1 M, 5 min. Elles sont ensuite lavées 7 fois 2 min dans l'eau distillée et contrastées à l'acétate d'uranyl. Les grilles sont incubées 5 minutes dans l'acétate d'uranyl 1% - eau, puis 10 minutes dans de l'acétate d'uranyl 5% pH4 - méthylcellulose 2% sur la glace. Les étapes avec l'acétate d'uranyl sont réalisées à l'obscurité. Le surplus de méthylcellulose est enlevé en passant les grilles sur buvard. Ces dernières sont stockées à l'abri de la poussière.

Article 1

Sécrétion d'exosomes par des neurones matures et sa régulation par l'activité synaptique glutamatergique

En 2006, notre laboratoire a démontré que les neurones corticaux en développement (8 jours en culture) sécrètent des exosomes. Les exosomes neuronaux contiennent des marqueurs exosomaux classiques, comme Alix, Flotilline-1 et Tsg101, mais aussi des protéines neurones-spécifiques comme la molécule d'adhésion neuronale L1_{CAM}, les sous-unités des récepteurs AMPA au glutamate GluR2/3, et la protéine du prion endogène PrP-c (Faure et al., 2006). Ces résultats suggèrent que les exosomes pourraient participer à la physiologie normale de la synapse, en échangeant des récepteurs aux neurotransmetteurs entre synapses. Gaëlle Lachenal a entrepris de montrer cela en étudiant la façon dont l'activité synaptique peut réguler la sécrétion d'exosomes neuronaux (Appendix : article 1). Cet article, paru en 2011, démontre que des neurones matures sécrètent des exosomes. Les neurones utilisés sont des neurones corticaux à 15 jours de culture et des neurones d'hippocampe à 21 jours de culture. La sécrétion des exosomes par les neurones matures est directement régulée par une entrée de Ca²⁺ et par l'activation des récepteurs AMPA et NMDA synaptiques. De plus, la partie C-terminale de la chaîne lourde de la toxine du tétanos, qui est endocytée par les neurones en culture, est sécrétée en association avec les exosomes. Ma contribution à ce travail a été la suivante : j'ai participé à la démonstration de la sécrétion d'exosomes par les neurones d'hippocampe, j'ai réalisé des observations quant à la régulation de la sécrétion exosomale par les neurones corticaux. J'ai étudié l'endocytose de la partie C-terminale de la chaîne lourde de la toxine du tétanos dans les neurones en culture et j'ai participé à la démonstration de sa sécrétion par la voie des exosomes. Certaines de mes observations en lien avec les travaux publiés n'apparaissent pas dans l'article paru. Dans ce manuscrit de thèse, je les ai regroupées dans le chapitre intitulé : Article 1, données supplémentaires.

I. Résultats

1. La sécrétion d'exosomes par des neurones matures est régulée par le calcium intracellulaire

En 2006, Julien Fauré *et al* avaient démontré que la dépolarisation des neurones corticaux en développement augmentait la sécrétion exosomale. Les premiers résultats de l'article 1 montrent qu'il en est de même avec des neurones matures. A 15 jours de culture, les neurones ont été incubés pendant 3h dans un milieu dépolarisant contenant 25 mM de KCl afin d'augmenter l'activité

neuronale. Les exosomes sont ensuite purifiés sur gradient continu de sucrose et l'immunodétection en Western blot avec l'anti-Flotilline-1 montre la présence de vésicules flottant à une densité comprise entre 1.09 et 1.15 g/ml, également marquées par Alix, L1 et GluR2/3 (figure 1 de l'article). L'augmentation du signal Flotilline-1 par rapport à un gradient réalisé à partir d'exosomes de neurones incubés 3h en K5 (milieu non dépolarisant contenant 5 mM de KCl) montre que la dépolarisation membranaire augmente bien la sécrétion exosomale par les neurones matures.

Dans le but d'étudier la régulation de l'étape précise de fusion des MVE avec la membrane plasmique, le temps de récolte des exosomes a été réduit à 5 minutes. Durant ce laps de temps, la quantité d'exosomes sécrétés est trop faible pour visualiser ces derniers sur un gradient de sucrose. L'observation en microscopie électronique (ME) des vésicules présentes dans un culot 100 000 g (étape ultime avant le gradient) démontre la présence de vésicules ayant la taille et la forme des exosomes, pouvant être marquées en immunogold avec un anti-L1 et un anti-GluR2 (figure 2D).

Nous avons démontré qu'une augmentation du calcium intracellulaire par incubation des neurones avec de la ionomycine (un ionophore du calcium) augmente significativement la sécrétion des exosomes (figure 2A-C). La pré-incubation des neurones pendant 15 minutes avec le BAPTA-AM qui chélate le calcium intracellulaire annule l'augmentation induite par la ionomycine, confirmant que c'est bien une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire qui favorise la fusion des endosomes multivésiculés avec la membrane plasmique (figure 2E, F).

2. L'observation en microscopie électronique de neurones en culture révèle la présence d'exosomes sécrétés, à proximité de la membrane plasmique

Des neurones corticaux à 15 jours de culture ont été incubés avec de la ionomycine et observés en microscopie électronique. La figure 3 montre la présence de paquets de vésicules au voisinage proche de la membrane plasmique des dendrites et du soma (figure 3B). Des images similaires ont pu être obtenues sur des neurones à 8 DIV (figure 3A). La forme et la taille des vésicules repérées sont comparables à celles des vésicules culottées à 100 000 g à partir des surnageants de culture (figure 2 D). De plus, la taille et le nombre de ces vésicules apposées à la membrane plasmique sont comparables à celles des vésicules intraluminales (ILV) contenues dans les MVE (figure 3 A, B). Dans certains cas, nous avons été en mesure d'observer des MVE semblant fusionner avec la membrane plasmique (figure 3C).

3. La GFP-TTC est sécrétée par voie exosomale

Dans le but de prouver que les exosomes analysés dans ces expériences proviennent bien de compartiments endosomaux neuronaux, nous avons utilisé la partie C-terminale de la chaîne lourde

de la toxine du tétanos (TTC) couplée à la GFP (GFP-TTC). Cette protéine a la capacité de se lier spécifiquement aux neurones et des études ont montré son endocytose et son transport dans les neurones, de façon similaire à la toxine entière (Bordet et al., 2001; Francis et al., 2004). Les neurones ont été pré-incubés une heure avec la GFP-TTC ou la GFP, puis les exosomes récoltés pendant 5 minutes ont été analysés en Western blot avec un anti-GFP. La figure 4 A montre que la GFP-TTC est présente dans le culot 100 000 g tandis que la GFP seule ne l'est pas. La quantité de GFP-TTC sécrétée et culottée par ultracentrifugation augmente significativement avec un traitement des neurones avec 2 μ M de ionomycine, ce qui renforce nos observations précédentes (figure 4B). Les exosomes récoltés ont ensuite été séparés sur gradient continu de sucrose. Détectée en Western blot grâce à un anti-GFP, la GFP-TTC flotte dans les mêmes fractions que la Flotilline-1 (figure 4C). Ces analyses montrent que la GFP-TTC est sécrétée par les neurones en association avec les exosomes. Des analyses en cryo-microscopie ont confirmé la présence de la GFP-TTC sur les ILV à l'intérieur des endosomes multivésiculés, ainsi que sur des paquets d'exosomes apposés à la membrane plasmique (figure 4 D, E). Ces résultats montrent que les paquets de vésicules observés contre la membrane plasmique dans les cultures proviennent bien de compartiments endosomaux neuronaux. Ils sont également la première démonstration qu'une protéine connue pour se propager dans le système nerveux entre les neurones par voie trans-synaptique est associée aux exosomes.

4. La sécrétion d'exosomes est régulée par l'activité glutamatergique

Les neurones corticaux ont été incubés avec la bicuculline, un inhibiteur des récepteurs GABAergiques, afin d'augmenter l'activité des synapses glutamatergiques. Comme montré sur la figure 5 (A et B), une augmentation drastique de la sécrétion exosomale est observable après 10 minutes d'incubation avec la bicuculline. L'addition de CNQX, antagoniste des récepteurs AMPA, ou de MK801, qui inhibe les récepteurs NMDA, réduit significativement la sécrétion exosomale en présence de bicuculline. Ces résultats montrent qu'il existe une régulation de la sécrétion exosomale par les récepteurs AMPA et NMDA synaptiques. L'incubation des neurones corticaux avec la picrotoxine, un autre inhibiteur des récepteurs GABAergiques a un effet similaire à celui de la bicuculline (figure 5C). L'ensemble de ces observations montre que la sécrétion des exosomes par des neurones en culture est régulée par l'activité synaptique glutamatergique.

II. Conclusion de l'article 1

Cet article montre que les neurones corticaux matures sécrètent des exosomes ayant une taille, une densité et une forme similaires aux exosomes sécrétés par les neurones corticaux en développement. Par l'utilisation d'un ionophore du calcium et des temps de récolte courts, cette publication apporte la démonstration forte que la fusion des MVE avec la membrane plasmique dans les neurones est régulée par la concentration en calcium intracellulaire. De plus, l'activité synaptique glutamatergique augmente drastiquement la quantité d'exosomes sécrétés en 10 minutes. Ce résultat suggère fortement que les exosomes participeraient à la physiologie de la synapse. En outre, la microscopie électronique a permis l'observation de figures de fusion de MVE avec la membrane plasmique. Elle a également permis la détection de la protéine de fusion GFP-TTC dans les MVE et dans les exosomes, ce qui montre bien qu'il s'agit de vésicules provenant de compartiments endosomaux neuronaux. C'est la première démonstration qu'une protéine connue pour être transférée trans-synaptiquement entre les neurones *in vivo* est sécrétée par voie exosomale. Nos observations suggèrent que la toxine du tétanos pourrait passer de neurone en neurone par la voie des exosomes.

Article 1, données supplémentaires

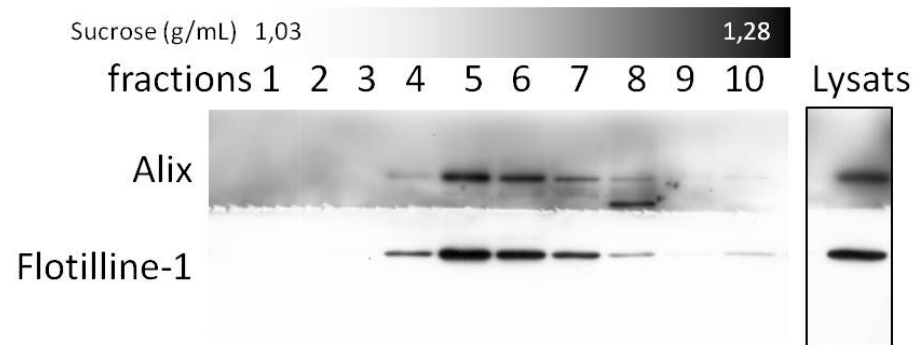
I. Caractérisation de la sortie des exosomes de neurones corticaux en culture

Julien Fauré et Gaëlle Lachenal ont tous deux démontré que la dépolarisation membranaire augmente la sortie des exosomes chez les neurones jeunes et chez les neurones matures. Pour mesurer l'effet produit par la dépolarisation, je me suis penchée sur la sécrétion non stimulée des neurones en culture en comparaison de neurones dépolarisés pendant 3h en K25 (milieu basal contenant 25 mM de KCl). Pour cela, des neurones corticaux ont été incubés dans du milieu conditionné préalablement ultracentrifugé et réchauffé, bouchon entrouvert dans l'étude de culture. Nous avons appelé ce milieu MCEF (milieu conditionné *exosome-free*). Les cellules ont été placées dans ce milieu MCEF pendant 64h. Le jour de la récupération de ces surnageants, d'autres neurones (en quantité égale, environ 25 millions de cellules) ont été placés 3h en K25. Les surnageants de ces deux conditions de sécrétion ont été traités en parallèle. Les microvésicules purifiées et culottées à 100 000 g ont été déposées sur des gradients continus de sucrose distincts dont les fractions ont été analysées en Western blot ([Figure S24](#)). La comparaison des signaux est éloquent. Pour les neurones stimulés 3h en K25, les fractions exosomales sont aisément repérées grâce aux signaux Alix et Flotilline-1 (pics dans les fractions 5 et 6). En revanche, pour les neurones incubés 64h en MCEF, le signal Flotilline-1 repéré dans les mêmes fractions est très faible et le signal Alix n'a pu être exploité (bruit de fond).

Cette expérience laisse penser que sans stimulation externe, les neurones en culture sécrètent peu d'exosomes. Ce serait oublier que les exosomes sécrétés dans le MCEF par les neurones durant 64h ont pu être repris par les cellules environnantes ou dégradés. Elle confirme le fort impact d'une dépolarisation sur la sortie des exosomes.

L'inconvénient de cette dépolarisation pendant 3h est qu'elle peut s'avérer toxique pour les neurones en culture. Nous nous sommes alors tournés vers la stimulation de la sortie des exosomes via l'activité synaptique neuronale.

3h en K25



64h en MCEF



Figure S24 Comparaison de la sécrétion exosomale non stimulée avec celle induite par la dépolarisation membranaire. Des neurones corticaux à 15 DIV ont été soit stimulés 3h dans une solution dépolarisante contenant 25 mM de KCl (K25) soit placés dans du milieu conditionné dépourvu d'exosomes (MCEF) pendant 64h. Les exosomes sécrétés dans les deux conditions ont été récoltés et déposés sur un gradient de sucrose. Les lysats cellulaires et les fractions du gradient ont été analysés en Western blot avec des anticorps dirigés contre Alix et Flotilline-1.

La bicuculline, un antagoniste des récepteurs GABA_A, stimule indirectement l'activité glutamatergique en bloquant l'activité des synapses inhibitrices. Dans l'article 1, nous avons constaté que son utilisation entraînait une sortie massive d'exosomes neuronaux culottés à 100 000 g. J'ai analysé l'effet de la bicuculline sur des exosomes séparés sur gradient de sucrose et j'ai comparé son impact sur la sécrétion exosomale avec celui de la dépolarisation membranaire. Pour cela, j'ai récupéré les exosomes sécrétés par un même nombre de neurones (8 millions de cellules environ) ayant été stimulés soit par la bicuculline pendant 10 minutes soit par la dépolarisation membranaire pendant 3h. La comparaison des signaux Alix obtenus pour chacun des gradients de sucrose est sans équivoque : la bicuculline a un effet beaucoup plus fort que la dépolarisation membranaire ([Figure S25A](#)). Et ceci est d'autant plus convaincant que l'effet observé avec la bicuculline sur la sécrétion exosomale est extrêmement rapide (10 min dans du K5+bicuculline *versus* 3h en K25).

La [Figure S25B](#) permet de comparer les culots 100 000 g obtenus à l'issue de différents *timings* de sécrétion. Quel que soit le temps d'incubation utilisé pour la bicuculline (30 minutes, 3h, 16h), son effet est drastique comparé à celui produit par les 3h en K25. Il apparaît qu'il n'est pas nécessaire d'incuber les neurones pendant un temps long pour observer l'effet stimulant de la bicuculline sur la sortie des exosomes. Enfin, face aux problèmes de toxicité parfois observés avec la dépolarisation membranaire durant 3h, j'ai vérifié l'état de forme des neurones après incubation avec de la bicuculline. La morphologie des neurones et l'état de leurs noyaux (non condensés) permettent d'affirmer la non-toxicité de ce mode de stimulation pour les neurones ([Figure S25D](#)).

Dans l'article 1, l'effet de la bicuculline sur les exosomes est quantifié mais n'est pas corrélé avec son action physiologique sur les MAPkinases Erk 1 et 2. En effet, lorsque la bicuculline inhibe les neurones GABAergiques, cela stimule les neurones glutamatergiques, ce qui entraîne dans ces neurones une cascade de réactions dont la phosphorylation des Erk1/2 (*extracellular-signal-regulated kinases*). Pour confirmer l'action de la bicuculline sur nos cultures primaires, nous avons lysé les cellules et vérifié la phosphorylation des MAPkinases Erk1/2. Lorsque l'on compare des lysats de neurones incubés dans du milieu basal K5 contenant 40 µM de bicuculline à des neurones non stimulés (placés dans du K5), on constate que l'action de cet antagoniste des récepteurs GABA_A est confirmée par la phosphorylation des *extracellular-signal-regulated kinases* (ERK) et s'accompagne d'une augmentation de la quantité d'exosomes sécrétés ([Figure S25C](#)).

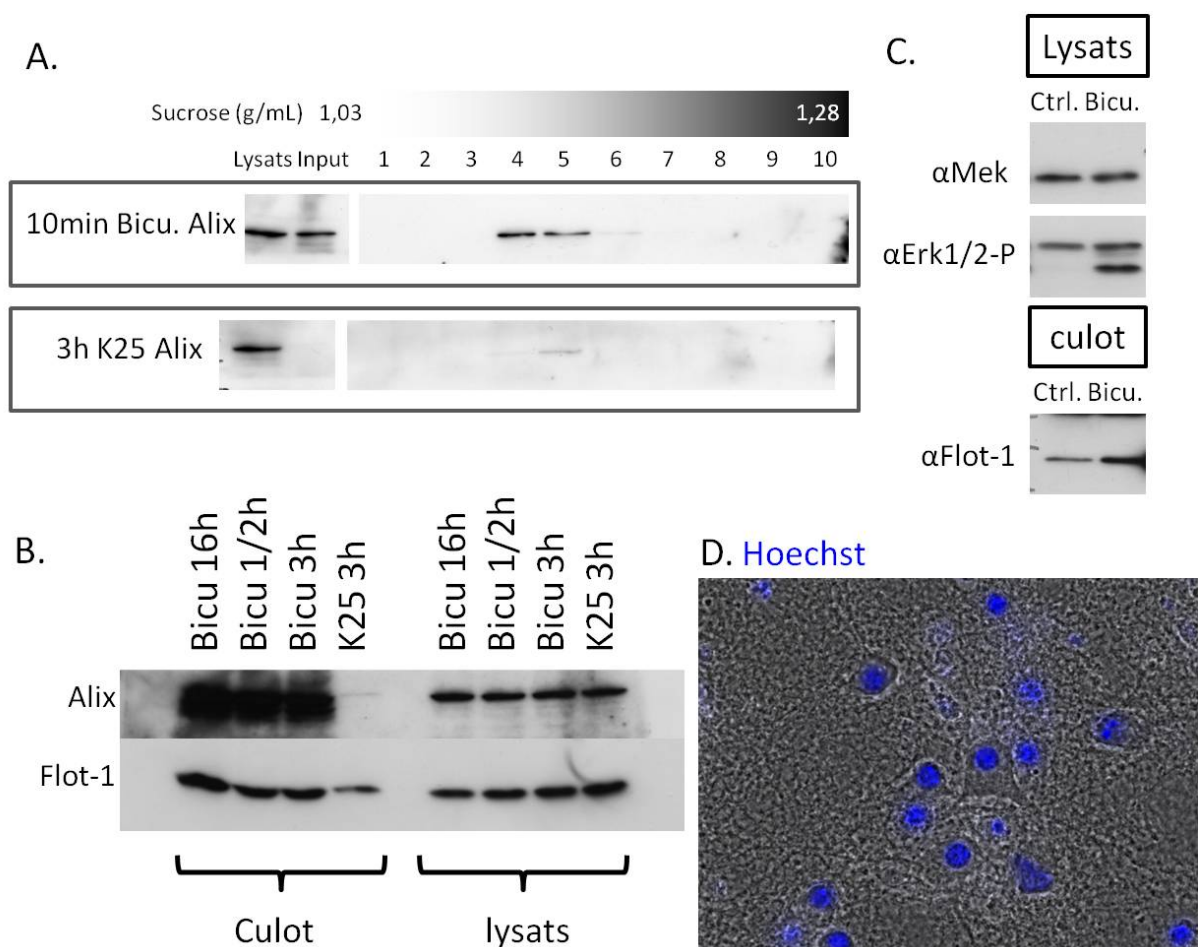


Figure S25 Analyse approfondie de l'action de la bicuculline sur la sécrétion d'exosomes par les neurones corticaux. A) les neurones corticaux à 15 DIV ont été incubés - soit dans du K5 contenant 40 μ M de bicuculline (Bicu.) pendant 10 minutes - soit 3h en K25. Les exosomes sécrétés à l'issue de ces deux protocoles de stimulation sont récupérés et traités en parallèle. Le culot 100 000 g (*input*: 5% de ce culot) est déposé sur un gradient continu de sucrose. Les lysats cellulaires, les *inputs*, et les différentes fractions du gradient sont analysés en Western blot, les exosomes sont détectés à l'aide d'un anticorps anti-Alix. B) Comparaison de la quantité d'exosomes sécrétés par des neurones incubés dans une solution contenant 40 μ M de bicuculline à des temps variés (16h, 30 min, 3h) avec des exosomes sécrétés par des neurones placés 3h dans une solution dépolarisante (K25). C) La bicuculline entraîne la phosphorylation des Map-kinases Erk1/2 et induit la sortie des exosomes. Les lysats neuronaux placés en milieu K5 contrôle (Ctrl.) ou en milieu de stimulation (40 μ M de bicuculline, Bicu.) et leurs exosomes (culot 100 000 g) sont analysés en Western blot. Les Map-kinases Erk1/2 non phosphorylées sont repérées avec un anti-Mek, les Map-kinases phosphorylées avec un anti-Erk1/2-P et les exosomes sont repérés avec un anti-Flotilline-1. D) les neurones ne souffrent pas de la stimulation en bicuculline ; vérification de l'état de forme des neurones après incubation dans du K5 contenant 40 μ M de bicuculline.

En dernier lieu, nous avons incubé des neurones corticaux avec de la tétrodotoxine (TTX), une neurotoxine qui bloque les potentiels d'action en se fixant aux canaux sodiques voltage-dépendants. La sortie des exosomes (détectés en Western blot avec un anti-Flotilline-1) est alors complètement inhibée (**Figure S26**). Cette dernière observation confirme que la sécrétion exosomale par des neurones en culture dépend strictement de l'activité synaptique des neurones.

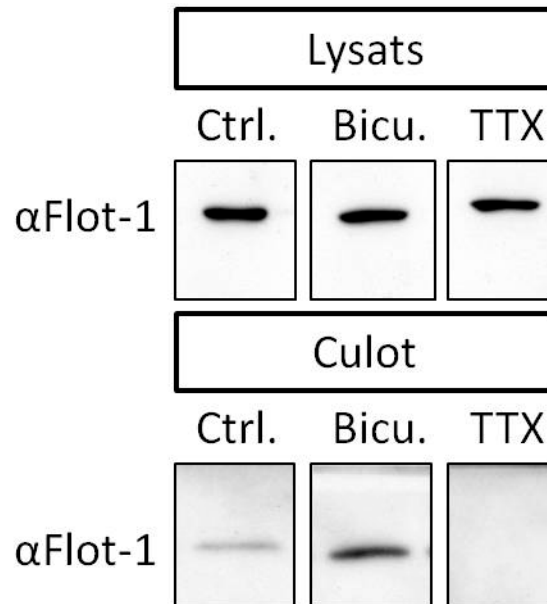


Figure S26 La sécrétion des exosomes par les neurones en culture est strictement reliée à l'activité synaptique. Des neurones corticaux à 15 DIV ont été incubés pendant 10-15 minutes dans du milieu contrôle K5 (Ctrl.), du milieu K5 contenant 40 μ M de bicuculline (Bicu.) ou du milieu K5 contenant 0,5 μ M de tétrodotoxine (TTX). Les lysats cellulaires et leurs exosomes (culot 100 000 g) ont été analysés en Western blot à l'aide d'un anticorps anti-Flotilline-1.

II. Trafic de la GFP-TTC dans des neurones en culture

Pour étayer notre hypothèse selon laquelle la TeNT pourrait être transportée par les exosomes, nous avons travaillé avec la partie C-terminale de la chaîne lourde de la toxine, appelée TTC. Non toxique, elle a conservé la spécificité de la TeNT pour les neurones et sa capacité de passage trans-synaptique rétrograde (Coen et al., 1997; Rind et al., 2005). Dans des cultures de cerveaux mélangés, la TTC ne se fixe pas aux cellules gliales GFAP-positives et il n'y a pas d'endocytose de la toxine sur ces cellules non neuronales (Bordet et al., 2001). La TTC peut donc être considérée comme une molécule neurotrophique.

Nous avons incubé la GFP-TTC sur des neurones d'hippocampe et observé qu'elle se fixait préférentiellement au niveau des extrémités pré-synaptiques comme nous le montre la Figure S27. Sur ces images de microscopie à fluorescence, la GFP-TTC colocalise avec les extrémités pré-synaptiques des neurones repérées par un anticorps dirigé contre la synaptophysine (Figure S27A, encart 2). A contrario, la GFP-TTC ne colocalise pas la PSD95, protéine associée à la densité post-synaptique (Figure S27B, encart 3). Ces observations concordent avec celles obtenues par d'autres (Matteoli et al., 1996; Rind et al., 2005). Sur la Figure S27A, on remarque que la GFP-TTC présente également un marquage ponctiforme qui semble situé à l'intérieur des dendrites et du corps cellulaire (Figure S27A, encart 1). Après 10 minutes d'incubation suivies de 30 minutes de chasse, il est effectivement possible d'observer de nombreuses vésicules GFP-positives à proximité de compartiments EEA1-positifs (Figure S27C). Nous avons constaté qu'il y avait généralement peu de colocalisation entre la toxine et les endosomes précoces marqués par EEA1. Lors de son internalisation dans les neurones d'hippocampe, il se peut que la GFP-TTC ne transite pas systématiquement (ou de manière très transitoire) dans les endosomes précoces repérés ici avec un anti-EEA1 et dont le pH est acide. Il est intéressant de noter que dans les motoneurones, les vésicules transportant la TeNT de manière rétrograde exposent un pH neutre, qui est maintenu constant pendant le transport (Bohnert and Schiavo, 2005).

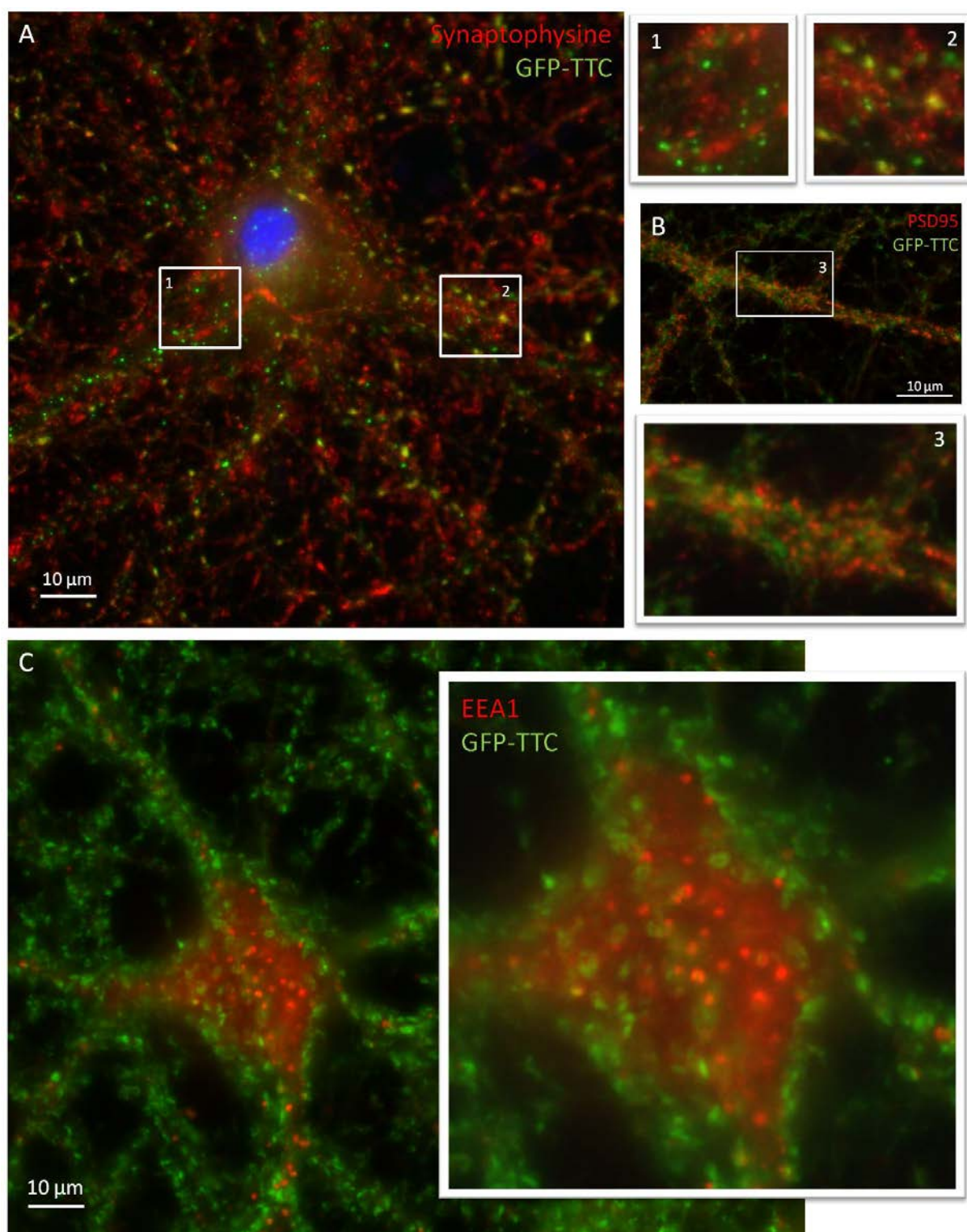


Figure S27 La GFP-TTC se fixe au niveau des extrémités pré-synaptiques et est endocytée par les neurones d'hippocampe. Panneau du haut (A et B), des neurones d'hippocampe à 16 DIV ont été incubés 1h avec de la GFP-TTC, lavés puis fixés. A) la GFP-TTC colocalise avec la synaptophysine (repérée par immunofluorescence en rouge). L'encart 1 rend compte de GFP-TTC déjà internalisée ; l'encart 2 permet de visualiser de la GFP-TTC localisée en partie pré-synaptique. B) la GFP-TTC ne se fixe pas aux extrémités post-synaptiques, repérées avec un anticorps anti-PSD95 (encart 3). C) la GFP-TTC est internalisée par les neurones d'hippocampe. Des neurones hippocampiques âgés de 24 DIV ont été incubés 10 min avec la GFP-TTC puis rincés et remis dans leur milieu conditionné pendant 30 minutes (chasse). Les endosomes précoces sont repérés avec un anticorps anti-EEA1 (IF, en rouge). La GFP-TTC est retrouvée dans des compartiments internes ronds à proximité d'endocytose EEA1-positifs. Microscopie à fluorescence, 100X.

Pour suivre la sortie de la GFP-TTC dans les exosomes, nous avons travaillé avec des neurones corticaux. Les dissections réalisées à partir des cortex d'embryons de rat nous permettent de mettre en culture un grand nombre d'individus (plus de 100 millions de cellules pour une dissection de 11 cerveaux en moyenne) et ainsi de maximiser les quantités d'exosomes sécrétés. Dans l'article 1, nous avons montré en microscopie électronique que la GFP-TTC incubée sur des neurones corticaux est localisée dans des MVE et dans des exosomes sécrétés dans le milieu extracellulaire (figure 4 de cet article). Nous avons également démontré par analyse protéique des exosomes en Western blot que la GFP-TTC pouvait être sécrétée par voie exosomale.

Dans l'article 1, nous avons incubé la GFP-TTC pendant 2h sur les neurones corticaux avant de stimuler ces derniers en K25 pour accroître la sortie des exosomes. Lorsque l'on incube les protéines de fusion GFP-TTC sur les neurones en culture, une partie est endocytée, certaines restent fixées à la surface des neurones. Il est tout à fait possible que les molécules GFP-TTC en excès puissent se fixer sur des exosomes une fois sécrétés dans le milieu extracellulaire. De plus, comme nous l'avons fait remarquer plus haut, les cultures primaires de neurones sont fragiles et l'incubation sur des temps longs dans une solution dépolarisante contenant 25 mM de KCl peut parfois s'avérer toxique pour les neurones. A contrario nous avons observé que la stimulation avec la bicuculline est rapide, efficace et non toxique pour les neurones ([Figure S25](#)). Ces différents constats nous ont poussés à améliorer notre protocole d'incubation-stimulation. Nous avons mis au point un protocole en quatre étapes (détaillées ci-dessous) permettant d'augmenter l'internalisation de la GFP-TTC et sa sécrétion exosomale.

1. La GFP-TTC est incubée directement dans le milieu des neurones en culture, à la concentration de 36 nM pendant 2h. Cette première étape va permettre la fixation de la majorité des protéines de fusion et l'internalisation de certaines.
2. Les neurones corticaux sont lavés et incubés pendant 5-10 minutes dans une solution dépolarisante contenant 50 mM de KCl (K50). Cette étape, qui a pour but d'augmenter l'endocytose de la TTC, est basée sur les travaux de Matteoli *et al.* Ces derniers ont démontré qu'une dépolarisation massive des neurones en culture favorisait l'internalisation de la TeNT ([Matteoli et al., 1996](#)).
3. la solution dépolarisante est remplacée par un milieu basal (K5) pour une chasse de deux heures.
4. la sortie des exosomes est stimulée en plaçant les neurones 15 minutes dans du K5 contenant 40 μ M de bicuculline et 100 μ M de 4-aminopyridine (4-AP). Le 4-AP, qui bloque les canaux potassiques, potentialise l'action de la bicuculline.

A la fin de chaque étape, des lamelles ont été fixées en vue d'une immunofluorescence pour suivre la localisation de la GFP-TTC dans les neurones.

La première étape consiste en l'incubation de protéines de fusion GFP-TTC pendant 2h sur les neurones corticaux. A l'issue de cette incubation, une immunofluorescence à l'aide d'un anticorps dirigé contre la synaptophysine a été réalisée pour marquer les parties pré-synaptiques. Nos observations en microscopie confocale à fluorescence nous ont permis de détecter de nombreuses colocalisations de la GFP-TTC avec la synaptophysine (**Figure S28**). Les images obtenues confirment que la GFP-TTC se fixe et est endocytée préférentiellement au niveau des membranes pré-synaptiques. Il est à noter la présence de nombreuses vésicules GFP-positives dans le corps cellulaire et les dendrites. L'utilisation du microscope confocal nous permet d'affirmer que ces compartiments sont intracellulaires. L'incubation pendant deux heures a déjà permis l'endocytose de GFP-TTC.

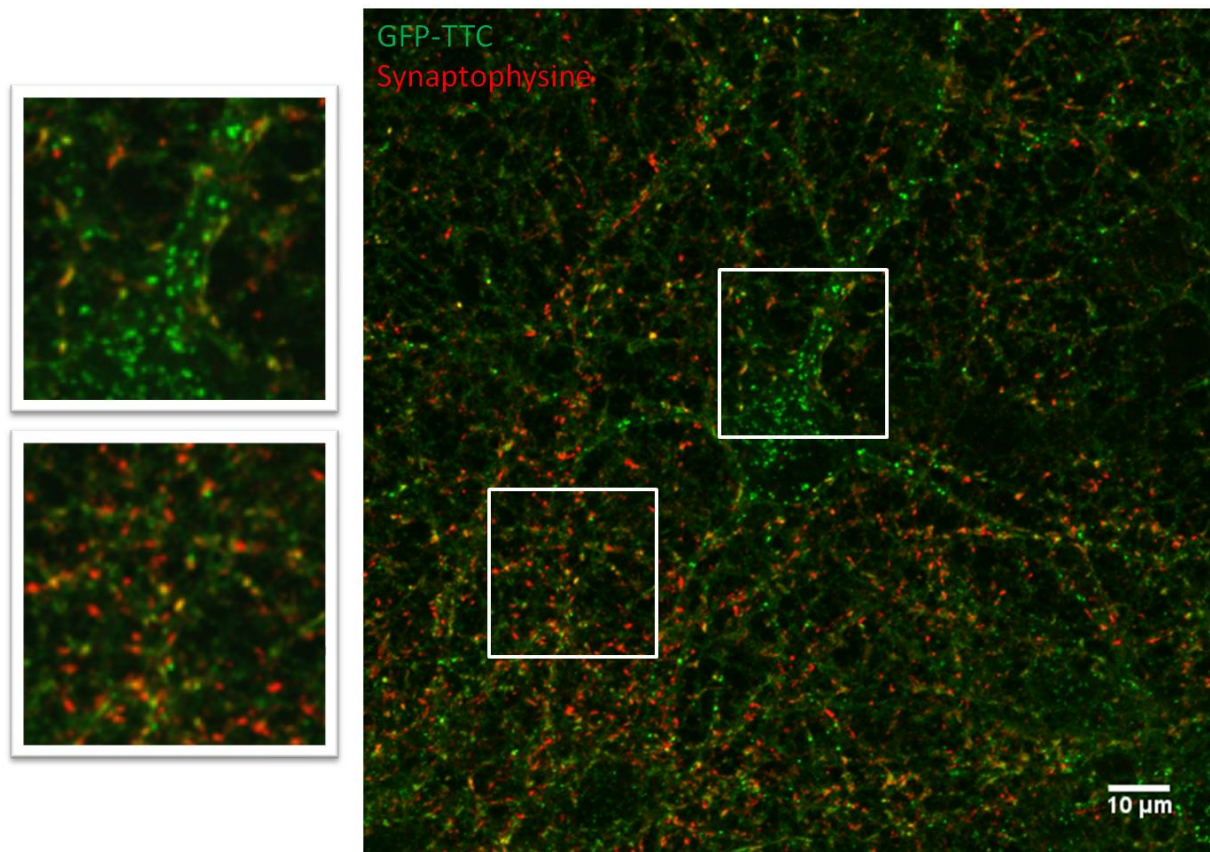


Figure S28 La GFP-TTC se fixe aux extrémités pré-synaptiques et est internalisée par les neurones corticaux. Des neurones corticaux à 15 DIV ont été incubés 2h avec de la GFP-TTC, lavés puis fixés. A l'issue de cette incubation, de la GFP-TTC est visible à l'intérieur du soma et des dendrites. Il est également possible de repérer de nombreuses colocalisations avec la synaptophysine visualisée en rouge grâce à un marquage en immunofluorescence. Microscopie confocale, image dans un plan donné.

Lors de la deuxième étape, la dépolarisation massive des neurones permet à la fois l'exocytose d'exosomes stock non marqués et renforce l'endocytose de la GFP-TTC (Faure et al., 2006; Matteoli et al., 1996). Cette dernière est majoritairement localisée au niveau des extrémités pré-synaptiques des neurones (repérées grâce au marquage de la synaptophysine). L'internalisation de la GFP-TTC stimulée ou non par la dépolarisation a donc lieu dans la même région subcellulaire : au niveau des synapses neuronales (Figure S29A, encarts). Une fois endocytée, elle est parfois retrouvée dans les endosomes précoces repérés avec un anticorps dirigé contre EEA1 (Figure S29B). La GFP-TTC a bien intégré la voie endocytaire.

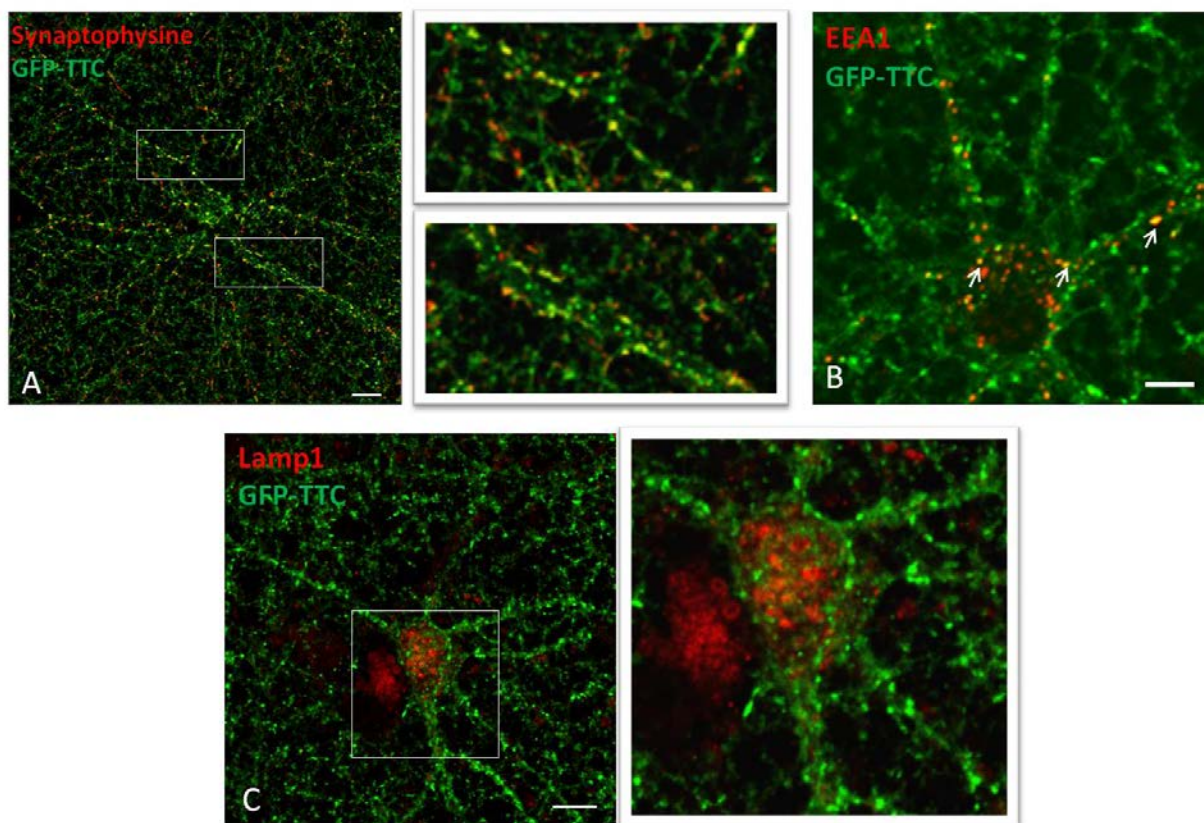


Figure S29 La dépolarisation membranaire augmente l'internalisation de la GFP-TTC par les neurones corticaux. Après avoir été incubés 2h avec la GFP-TTC, les neurones corticaux (15DIV) sont soumis à une dépolarisation membranaire (50 mM de KCl pendant 5-10 minutes). A) à l'issue de cette dépolarisation, la GFP-TTC est très majoritairement localisée au niveau des extrémités pré-synaptiques. On observe une colocalisation massive avec la synaptophysine repérée en IF en rouge (encarts) ; B) la dépolarisation a favorisé la fixation et l'endocytose de la GFP-TTC. Celle-ci est retrouvée dans des endosomes précoces marqués avec un anticorps anti-EEA1 (flèches) ; C) après la chasse de 2h, la majorité des protéines de fusion GFP-TTC sont retrouvées à l'intérieur des neurones mais ne partent pas dans une voie de dégradation lysosomale (IF anti-Lamp1 en rouge). Microscopie confocale, image dans un plan donné. Bar : 10 μ m.

La troisième étape consiste en une chasse de 2h en milieu basal K5 devant permettre à la GFP-TTC de progresser dans cette voie endosomale. Dans l'article 1, nous avons pu observer en microscopie électronique que la GFP-TTC se retrouve dans les MVE. Nous avons ici marqué les lysosomes à l'aide d'un anticorps dirigé contre Lamp1, protéine caractéristique de ces compartiments tardifs. Sur la [Figure S29C](#), il est possible d'observer que la GFP-TTC n'est plus située à la membrane plasmique des neurones, que ce soit au niveau du soma ou des neurites. La GFP-TTC semble avoir été totalement internalisée. Cependant, elle n'entre pas non plus dans une voie de dégradation comme semble l'indiquer l'absence de colocalisation avec Lamp1. Sur l'image sélectionnée, on peut repérer un corps cellulaire rempli de compartiments Lamp1 positifs mais vide de tout marquage GFP. Ce corps cellulaire accolé à celui du neurone observé doit probablement appartenir à une cellule gliale ([Figure S29C, encart](#)).

En dernier lieu, la libération d'exosomes est stimulée par une incubation des neurones avec la bicuculline pendant 15min. Sous l'effet de cette stimulation, les stocks de GFP-TTC cytoplasmique semblent avoir diminué, reflétant très certainement sa sécrétion par la voie des exosomes ([Figure S30A](#)). Pour le vérifier, les surnageants ont été récupérés et les exosomes purifiés sur gradient de sucrose. Chaque fraction du gradient a ensuite été analysée en Western blot. Les exosomes repérés grâce au signal Flotilline-1 se concentrent dans la fraction 5 du gradient (~1,13 g/mL). Le signal pour la GFP-TTC (repérée avec un anti-GFP) se concentre dans la même fraction que la Flotilline-1. La GFP-TTC a bel et bien été sécrétée via les exosomes neuronaux ([Figure S30B](#)).

De manière étonnante, il est possible d'observer une relocalisation de la GFP-TTC à la membrane, notamment au niveau pré-synaptique (marquage avec l'anticorps anti-synaptophysine). Une interprétation possible de cette relocalisation est qu'une partie des exosomes décorés de la GFP-TTC qui ont été relargués lors de la stimulation se sont fixés sur les parties pré-synaptiques ([Figure S30A](#)).

Dans les neurones corticaux en culture, la GFP-TTC se fixe majoritairement au niveau des parties pré-synaptiques. Elle est endocytée par ces neurones et se retrouve sécrétée par la voie des exosomes. Nous nous sommes demandé si les exosomes véhiculant la GFP-TTC pouvaient être recapturés par d'autres neurones (cf. Résultats, II).

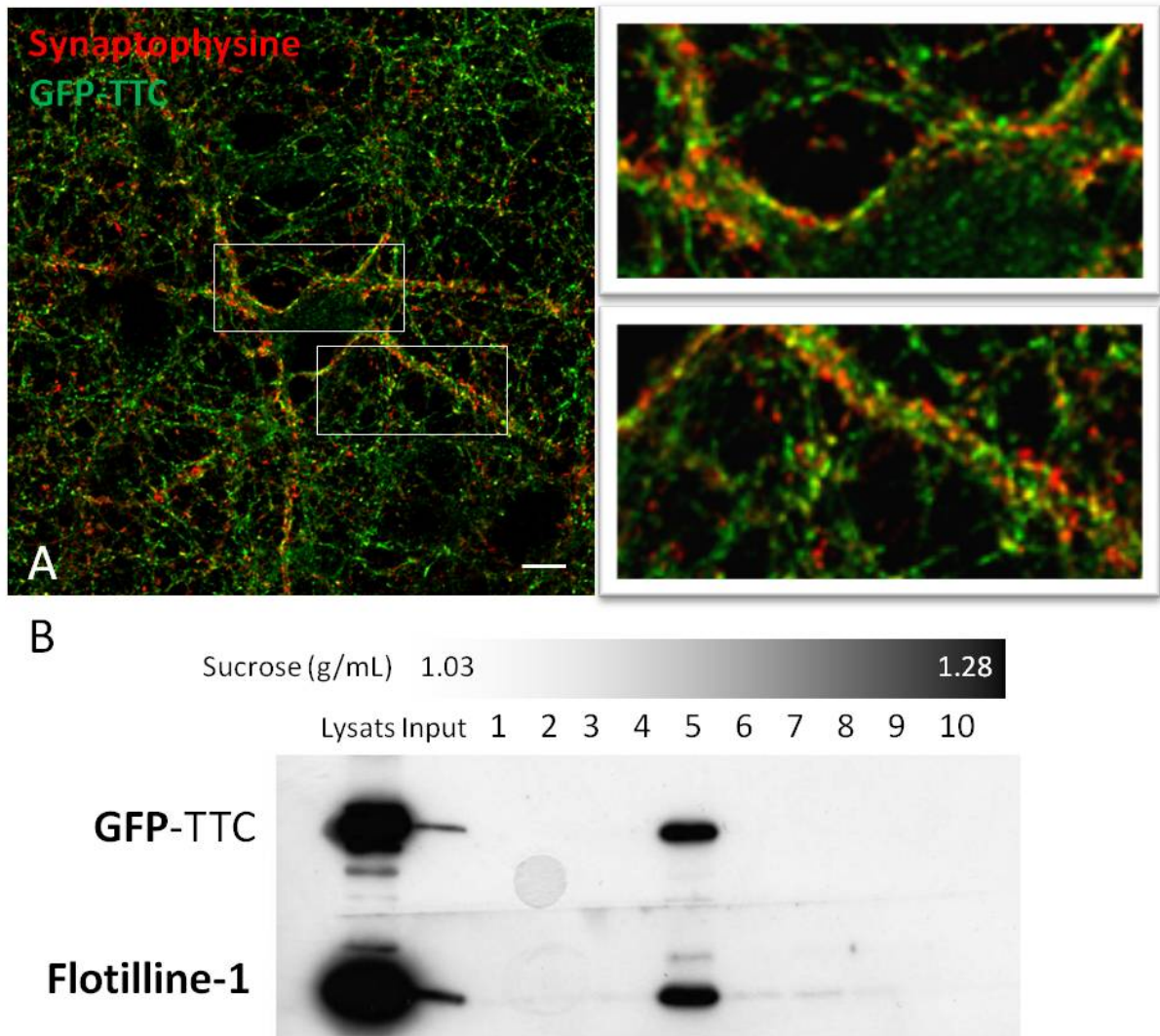


Figure S30 Sous l'effet de la bicuculline, les neurones corticaux sécrètent la GFP-TTC en association avec les exosomes. Les neurones corticaux (15 DIV) ont été incubés pendant 15 minutes avec 40 μ M de bicuculline et 100 μ M de 4-AP. A) la stimulation à la bicuculline induit une relocalisation de la GFP-TTC ; la protéine de fusion est surtout visible à la membrane des neurones et il est possible d'observer de nombreuses colocalisations avec la synaptophysine, ce qui traduit une localisation essentiellement au niveau pré-synaptique ; B) La GFP-TTC est sécrétée par la voie des exosomes. Les surnageants des neurones incubés avec la bicuculline ont été récupérés, les exosomes culottés à 100 000 g (*input* : 5% de ce culot) et déposés sur un gradient continu de sucrose. Les lysats cellulaires, l'*input* et les dix fractions du gradient ont été analysés en Western blot à l'aide des anticorps anti-GFP et anti-Flotilline-1. (A : microscopie confocale, image dans un plan donné, bar : 10 μ m).

Résultats

Les travaux du laboratoire ont permis de démontrer que les neurones sont capables de sécréter des exosomes et que cette sécrétion est régulée par l'activité synaptique. Nous nous sommes alors intéressés au devenir des exosomes une fois sécrétés. Au cours de ma thèse, j'ai développé différents outils afin de prouver le passage interneuronal d'exosomes et leur possible rôle dans le transfert de protéines et d'ARN.

La culture primaire de neurones permet de rendre accessibles à l'observation et à la manipulation des neurones vivants. Moins complexe que l'étude des tissus nerveux *in vivo*, la culture primaire représente néanmoins un bon outil de recherche sur la morphologie des neurones et le trafic des protéines neuronales. Les neurones mis en culture à partir de cortex d'embryons de rat représentent un grand nombre d'individus (plus de 100 millions de cellules pour une dissection de 11 cerveaux). Utilisés comme neurones sécréteurs, ils nous garantissent une quantité relativement importante d'exosomes sécrétés. Les neurones d'hippocampe, moins nombreux au départ (environ 4 millions de cellules pour une dissection de 11 cerveaux) représentent une population de choix pour l'observation en microscopie. Majoritairement constitués de neurones pyramidaux interconnectés de manière assez régulière et organisée, les neurones hippocampiques ont été utilisés comme neurones receveurs. Nos travaux ont combiné l'utilisation de ces deux types de cultures primaires à de la culture de lignée de neuroblastomes, cette dernière étant moins fastidieuse que la culture primaire de neurones. La lignée N2a (issue de neuroblastomes de souris) a déjà été utilisée comme modèle d'étude par des groupes de recherche travaillant sur les exosomes et leur possible rôle de dissémination d'agents pathogènes. Outre les travaux menés sur le prion PrP-sc associé aux exosomes sécrétés par des N2a infectées (Alais et al., 2008; Veith et al., 2009), il a été démontré dans des SH-SY5Y (lignée de neuroblastomes humains) que des métabolites d'APP (impliqués dans la maladie d'Alzheimer) étaient sécrétés dans les exosomes (Vingtdeux et al., 2007).

I. Suivi d'exosomes fluorescents

Afin de démontrer que les exosomes sont un moyen d'échange entre les cellules du SNC, nous avons élaboré un système d'étude avec des cellules donneuses (sécrétrices d'exosomes) et des cellules receveuses (réceptrices d'exosomes). Pour cela, j'ai développé un modèle cellulaire à partir de lignée de neuroblastomes N2a exprimant un marqueur exosomal fluorescent. Nous avons observé le

comportement de ces exosomes purifiés lorsqu'ils sont mis en contact avec des neurones d'hippocampe en culture.

1. Caractérisation des exosomes de N2a

Puisque nous souhaitions utiliser les N2a comme cellules donneuses, nous avons dans un premier temps vérifié que ces cellules sécrétaient des exosomes dans nos conditions de culture. Nous avons récupéré leurs surnageants et séparé les vésicules sécrétées sur un gradient continu de sucrose (Figure 31). Le contenu des différentes fractions du gradient a été analysé en Western blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Alix et un anticorps contre la Flotilline-1. Les signaux pour ces deux protéines, considérées comme des marqueurs exosomaux, sont concentrés dans quelques fractions centrales dont la densité est comprise entre 1,1 et 1,15 g/mL (Figure 31A). Les N2a sécrètent donc des vésicules contenant Alix et Flotilline-1 et dont la densité correspond à celle couramment évoquée dans la littérature pour caractériser les exosomes (Thery et al., 2006). Il est intéressant de noter que les signaux observés pour Flotilline-1 (fractions 4-5) sont décalés par rapport aux signaux Alix (fractions 5-6). Cette observation trouve un écho particulier dans les travaux de Baiëtti *et al* qui suggèrent l'existence de sous populations exosomales en constatant un comportement différent des exosomes Flotilline-1 positifs par rapport aux exosomes Alix (Baietti et al., 2012).

Après avoir vérifié la présence d'Alix et de Flotilline-1, d'autres anticorps ont été utilisés pour détecter la présence de CD63 et de L1_{CAM} dans les exosomes sécrétés par les N2a (Figure 31B). CD63 est une protéine transmembranaire appartenant à la famille des tétraspanines, un groupe de protéines associées à la surface cellulaire et caractérisées par la possession de quatre domaines transmembranaires. CD63, connue aussi sous le nom de *Lysosome Associated Membrane Protein 3* ou Lamp-3, est considérée comme un marqueur exosomal car très souvent retrouvée dans les analyses protéiques des exosomes (Escola et al., 1998; Simons and Raposo, 2009). Quant à L1_{CAM}, il s'agit d'une molécule d'adhésion cellulaire qui a été retrouvée dans les exosomes sécrétés par les neurones corticaux (Faure et al., 2006). Les signaux obtenus pour ces deux protéines se concentrent particulièrement dans les fractions 4 et 5. Ce profil de gradient confirme la présence de vésicules flottant à une densité moyenne de 1,13 g/mL qui contiennent les protéines L1_{CAM} et CD63.

Les N2a sécrètent donc des vésicules dont la densité et les protéines associées (Alix, Flotilline-1 et CD63) sont couramment évoquées par la communauté scientifique comme caractéristiques des exosomes. De plus, ces mêmes fractions sont positives pour la molécule d'adhésion intercellulaire L1_{CAM}. Le fait que L1 soit une molécule d'adhésion homophile (la molécule se fixe en trans à une autre molécule L1 de la surface cellulaire) en fait un excellent candidat pour médier l'adhésion et l'endocytose des exosomes par les neurones cibles (Rathjen and Schachner, 1984).

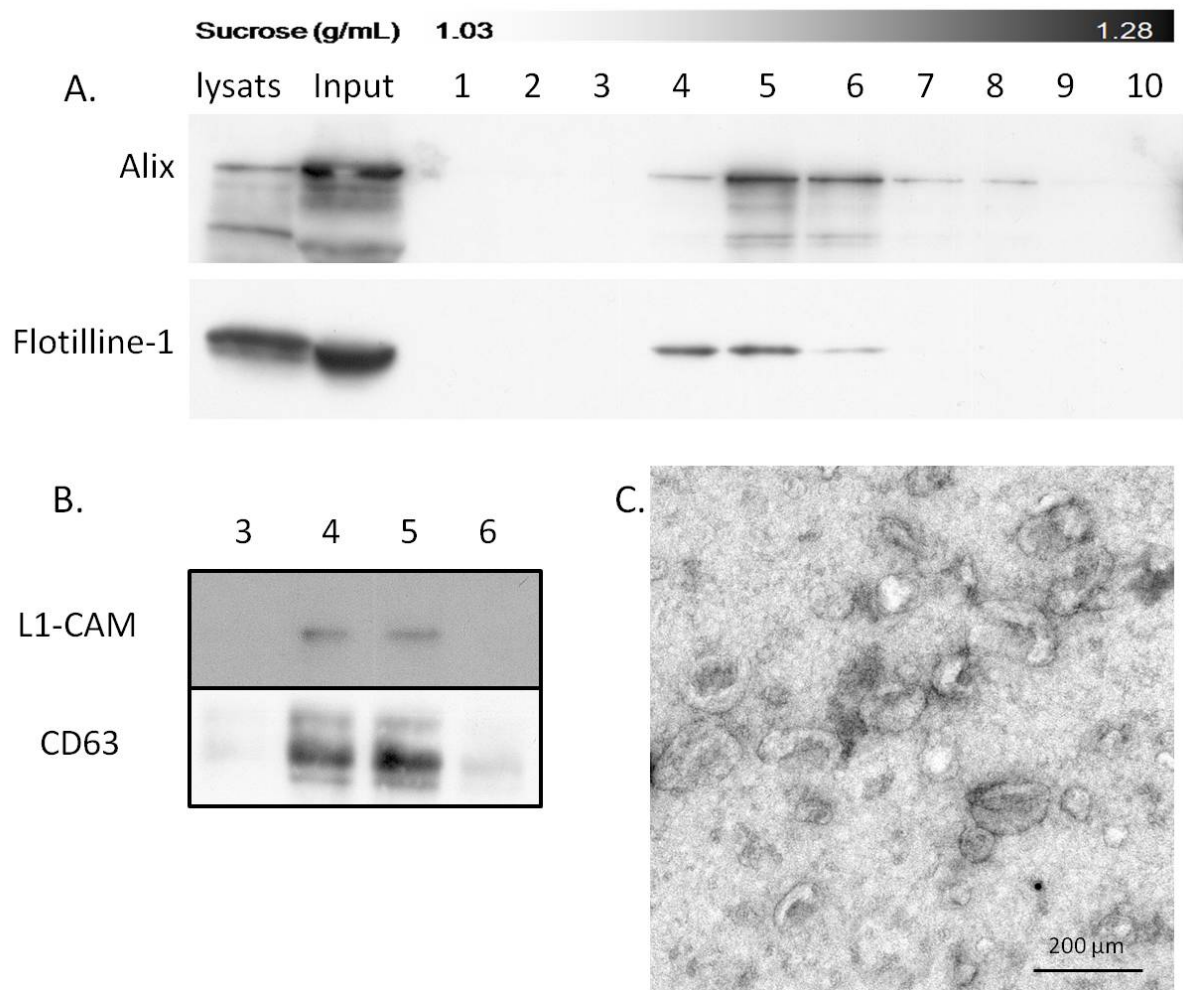


Figure 31 Caractérisation des exosomes sécrétés par les N2a. Les vésicules sécrétées par les N2a durant une nuit ont été purifiées par centrifugations différentielles et filtration puis culottées à 100 000 g. A) et B) le culot 100 000 g a été déposé sur un gradient continu de sucrose. Les lysats cellulaires, l'*input* (10% du culot 100 000 g) et les fractions du gradient ont été analysés en Western blot avec différents anticorps. La fraction 1 correspond au haut du gradient (densité $\sim 1,03$ g/mL), la fraction 10, au fond (densité $\sim 1,28$ g/mL). Le pic observé dans la fraction 5 correspond à une densité d'environ 1,13 g/mL. C) le culot obtenu à l'issue de l'ultracentrifugation à 100 000 g a été déposé sur une grille de microscopie électronique, contrasté à l'acétate d'uranyl et observé en MET.

Pour visualiser les vésicules sécrétées par les N2a, le culot 100 000 g (étape ultime avant le gradient) a été appliqué sur une grille de microscopie électronique (F. Hemming). L'analyse en ME de ce culot a démontré la présence de vésicules en forme d'hématies de taille variable. Nous avons en effet observé des vésicules d'environ 60 nm de diamètre côtoyant des vésicules plus grandes d'environ 150 nm (Figure 31C).

Ainsi les N2a sécrètent des vésicules dont le diamètre moyen est de 100 nm, la densité comprise entre 1,1 et 1,15 g/mL et contenant les protéines CD63, Alix et Flotilline-1. L'ensemble de ces données confirme que les N2a sécrètent des exosomes dans nos conditions de culture.

2. Choix d'un marqueur fluorescent

Nous avons abordé la problématique du transfert des exosomes par une approche en microscopie à fluorescence. Pour cela, nous avons cherché à rendre fluorescents les exosomes sécrétés par les N2a. Nous avons notamment transfecté ces cellules avec les plasmides codant pour les protéines de fusion suivantes :

- GFP-Alix (environ 130 kDa)
- Flotilline-1-GFP (environ 75 kDa)
- GFP-CD63 (environ 55 kDa)

Ces constructions plasmidiques ont été réalisées par Anne-Laure Mahul-Mellier, une ancienne doctorante du laboratoire. Nous avons testé en parallèle l'expression et la sécrétion exosomale de ces trois protéines de fusion (Figure 32A). A taux de transfection équivalents (~40%), nous avons constaté que Flotilline-1-GFP était faiblement exprimée par les cellules et non détectable dans les exosomes qu'elles sécrètent. La GFP-CD63, détectée par un anticorps anti-GFP est, elle, très enrichie dans les exosomes de N2a transfectées. Le même anticorps donne un signal extrêmement faible pour la GFP-Alix. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre Alix, montre que la protéine de fusion GFP-Alix sort dans les exosomes mais pas autant que la protéine endogène. Dans un gradient continu de sucrose, il est intéressant de remarquer un pic dans la fraction 5 pour la protéine de fusion GFP-Alix (détectée avec un anticorps anti-GFP) alors que le pic de la Flotilline-1 (endogène) se situe plutôt dans la fraction 4 (Figure 32B). Ces pics différentiels concordent avec ceux observés pour Alix endogène comparé à la Flotilline-1 (Figure 31A) et révèlent peut-être l'existence de sous-populations exosomales. GFP-CD63 étant particulièrement enrichie dans les exosomes de N2a transfectées, nous avons décidé d'utiliser cette protéine de fusion comme marqueur fluorescent de nos exosomes de N2a.

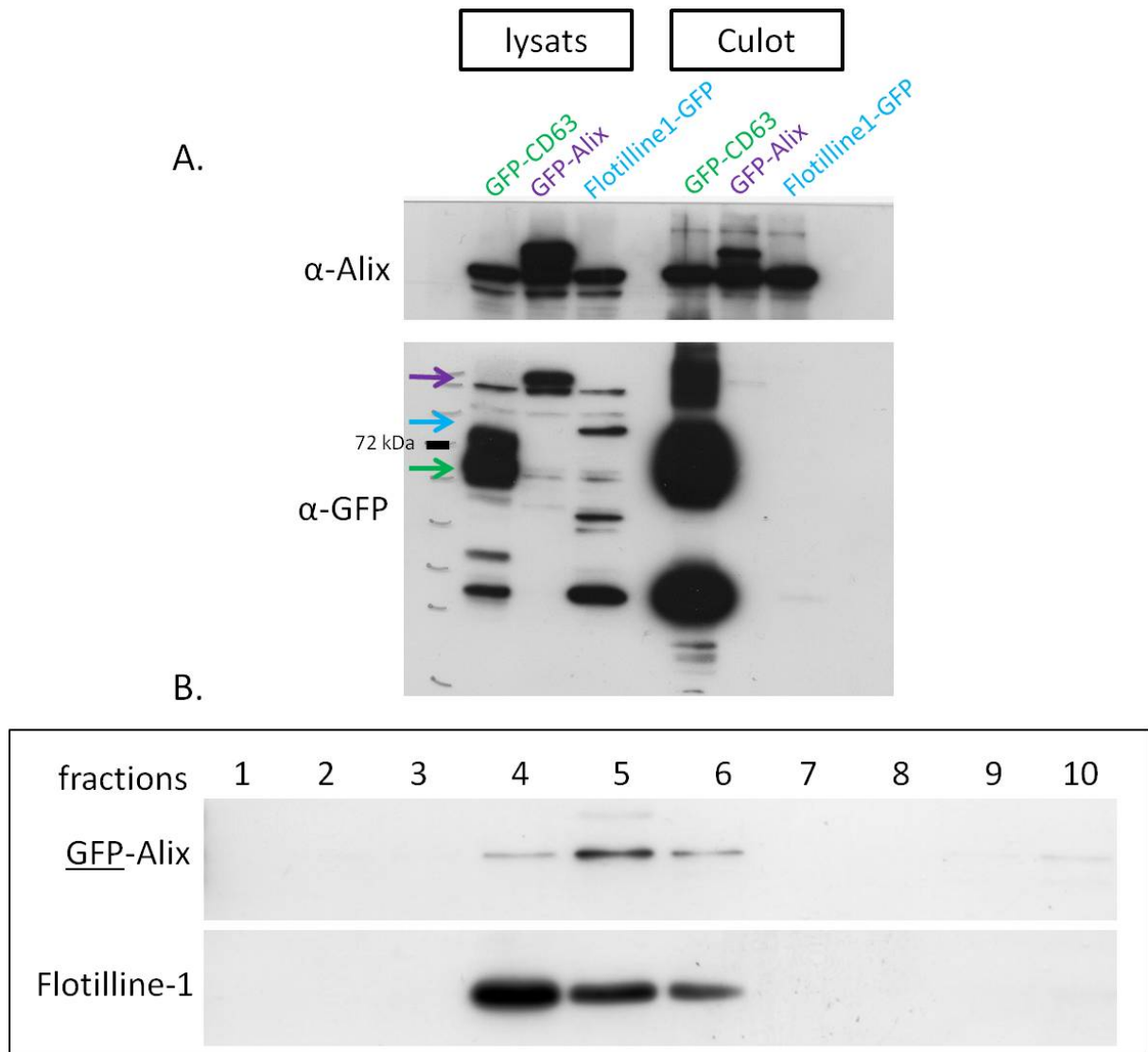


Figure 32 Sécrétion de protéines fluorescentes en association avec les exosomes de N2a transfectées. A) des cellules N2a ont été transfectées transitoirement avec des plasmides codant pour GFP-CD63 (code couleur : vert), GFP-Alix (violet) et Flotilline-1-GFP (bleu). Les lysats cellulaires et leurs exosomes (culot 100 000 g) ont été analysés en Western blot avec un anticorps dirigé contre la protéine Alix et contre la protéine GFP (*Green Fluorescent Protein*). B) les exosomes sécrétés par des N2a transfectées GFP-Alix ont été récoltés et séparés sur un gradient continu de sucrose. Les fractions du gradient ont été analysées en Western blot avec un anticorps anti-GFP et un anti-Flot-1. Le pic observé pour la protéine de fusion GFP-Alix correspond à une densité de 1,13 g/mL tandis que celui de la Flotilline-1 correspond à une densité de 1,1 g/mL.

i. Caractérisation des N2a transfectées GFP-CD63 et de leurs exosomes

Nous avons dans un premier temps travaillé avec des N2a transfectées transitoirement avec un plasmide codant pour GFP-CD63. CD63 est une tétraspanine, elle subit une palmitoylation avant son insertion dans la membrane plasmique. Elle forme alors avec d'autres tétraspanines des réseaux appelés « *tetraspanin web* » (Pols and Klumperman, 2009). Après endocytose, CD63 transite via les endosomes primaires et se localise plus particulièrement dans les MVE et les endosomes tardifs.

Dans les cellules transfectées, GFP-CD63 colocalise avec les MVE marqués grâce à l'acide lysobisphosphatidique (LBPA), un lipide qui jouerait un rôle dans la formation des endosomes multivésiculés (Figure 33A-D) (Subra et al., 2007).

Lorsque l'on purifie les exosomes de N2a transfectées GFP-CD63 sur gradient continu de sucrose et que l'on analyse chaque fraction en Western blot, on constate que les exosomes, qui flottent à une densité comprise entre 1,08 et 1,15 g/mL, contiennent bien la protéine de fusion GFP-CD63 (Figure 33E). En outre, la détection à l'aide d'un anticorps dirigé contre la GFP reconnaît aussi une bande migrant à un poids moléculaire correspondant à la GFP (27 kDa), qui semble également enrichie dans les exosomes (Figure 33E). De par sa conformation, les extrémités N et C-terminales de CD63 sont à l'intérieur des exosomes et donc la GFP fusionnée à la partie N-terminale se retrouve dans la lumière exosomale (schéma Figure 34). Cette bande supplémentaire pourrait être un produit de clivage par une protéase contenue dans les vésicules intraluminales, les futurs exosomes. La GFP étant soluble, le fait qu'elle flotte dans le gradient de sucrose s'explique par son emprisonnement dans la lumière des exosomes GFP-CD63.

Les N2a transfectées GFP-CD63 sécrètent des exosomes contenant à la fois la protéine de fusion et la GFP seule. Nous avons ainsi validé la production d'exosomes fluorescents pouvant être suivis en microscopie à fluorescence dans le but d'étudier le passage intercellulaire des exosomes.

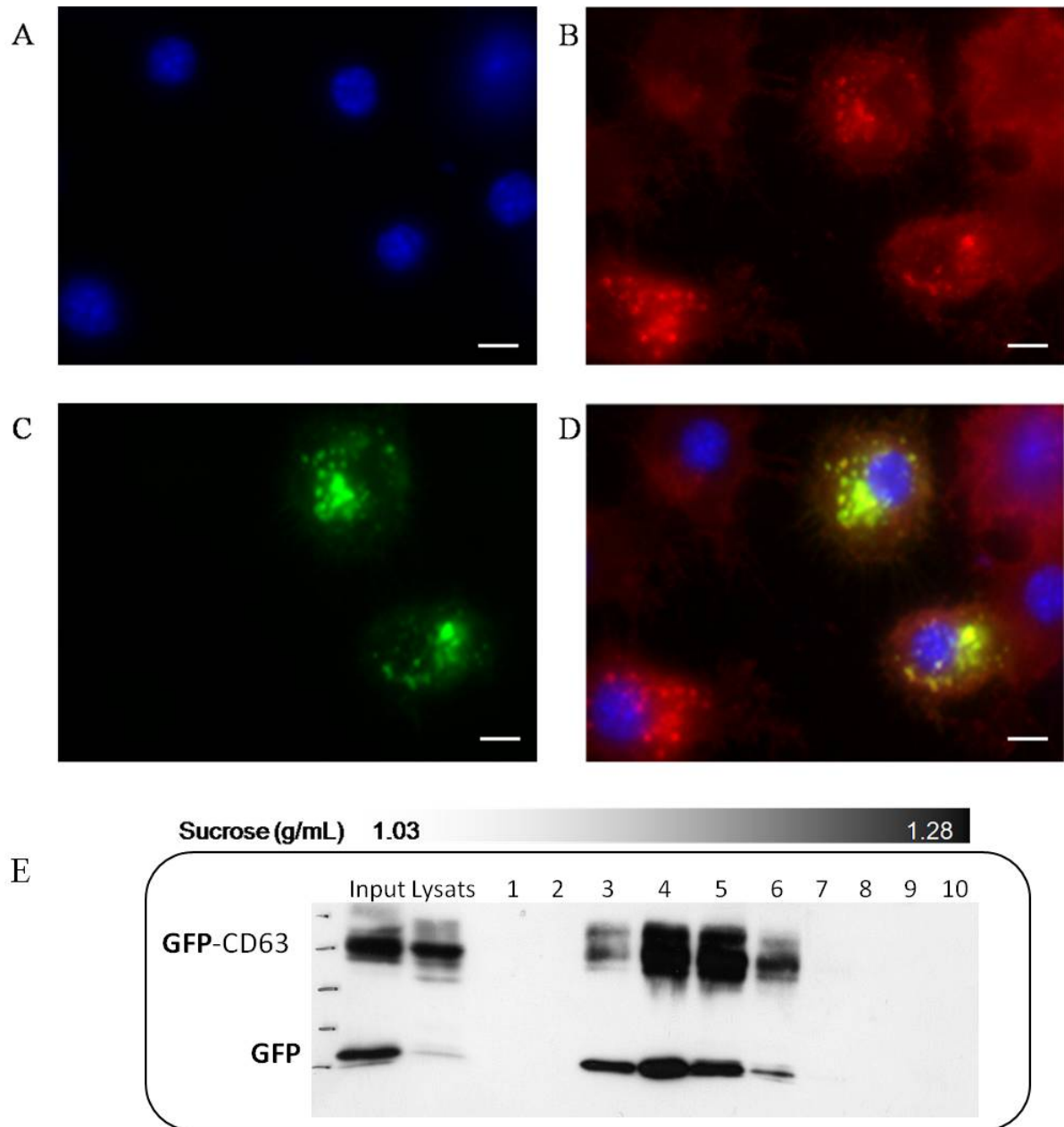


Figure 33 Dans des cellules N2a transfectées, la GFP-CD63 colocalise avec le LBPA, un lipide concentré dans les MVE et sort en association avec les exosomes. A-D) GFP-CD63 est localisée principalement dans les MVE des cellules transfectées observées en microscopie à fluorescence ; A) marquage des noyaux en DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole). B) marquage avec l'anticorps 6C4 dirigé contre le LBPA associé aux MVE. C) détection de GFP-CD63. D) en superposant les images, on constate que GFP-CD63 se trouve dans les endosomes tardifs des N2a transfectées. Bar : 20 μ m. E) les exosomes de N2a transfectées GFP-CD63 contiennent la protéine de fusion et la GFP seule. Les exosomes ont été récoltés, le culot 100 000 g déposé sur un gradient continu de sucrose. Les lysats cellulaires, l'*input* (10% du culot 100 000 g) et les différentes fractions du gradient ont été analysés en Western blot avec un anticorps anti-GFP.

ii. Etablissement d'une lignée N2a exprimant de manière constitutive la GFP-CD63

Afin de pouvoir disposer en permanence d'exosomes GFP-CD63 et nous passer de l'étape de transfection transitoire, nous avons sélectionné, par dilution limite, un clone de N2a exprimant de manière stable la protéine de fusion. Nous avons comparé l'expression et la sécrétion exosomale de GFP-CD63 pour cette lignée clonale par rapport à des cellules transfectées transitoirement. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la GFP en Western blot donne le même genre de profil pour la lignée stable et les cellules transfectées (Figure 34A). En effet, même si la transfection transitoire maximise l'enrichissement de GFP-CD63 dans les exosomes sécrétés par ces cellules, la protéine de fusion est également bien présente dans les exosomes sécrétés par la lignée stable. De plus, les exosomes sécrétés par cette lignée GFP-CD63 semblent également contenir de la GFP emprisonnée dans la lumière de l'exosome (schéma Figure 34).

Les exosomes sécrétés par cette lignée ont été culottés à 100 000 g et observés en microscopie électronique (Figure 34B). Un marquage immunogold avec un anticorps dirigé contre la tétraspanine CD63 a permis de confirmer la présence de cette protéine transmembranaire dans ces exosomes. Afin de détecter la GFP dans la lumière exosomale, l'incubation avec l'anticorps été réalisée après perméabilisation. La préparation obtenue démontre la présence de vésicules d'environ 60 nm qui contiennent bien la GFP repérée grâce au marquage immunogold (F. Hemming). Il est à noter que nos observations en ME sur les exosomes de N2a ont montré l'existence de petites vésicules (environ 60 nm) et de plus grandes (environ 150 nm), toutes en forme d'hématies. Néanmoins seules les petits exosomes présentent des marquages positifs pour CD63 et GFP (Figure 31C ; Figure 34B).

Avec l'obtention de cette lignée GFP-CD63, nous sommes parvenus à mettre au point un système de cellules donneuses, sécrétrices d'exosomes fluorescents en continu.

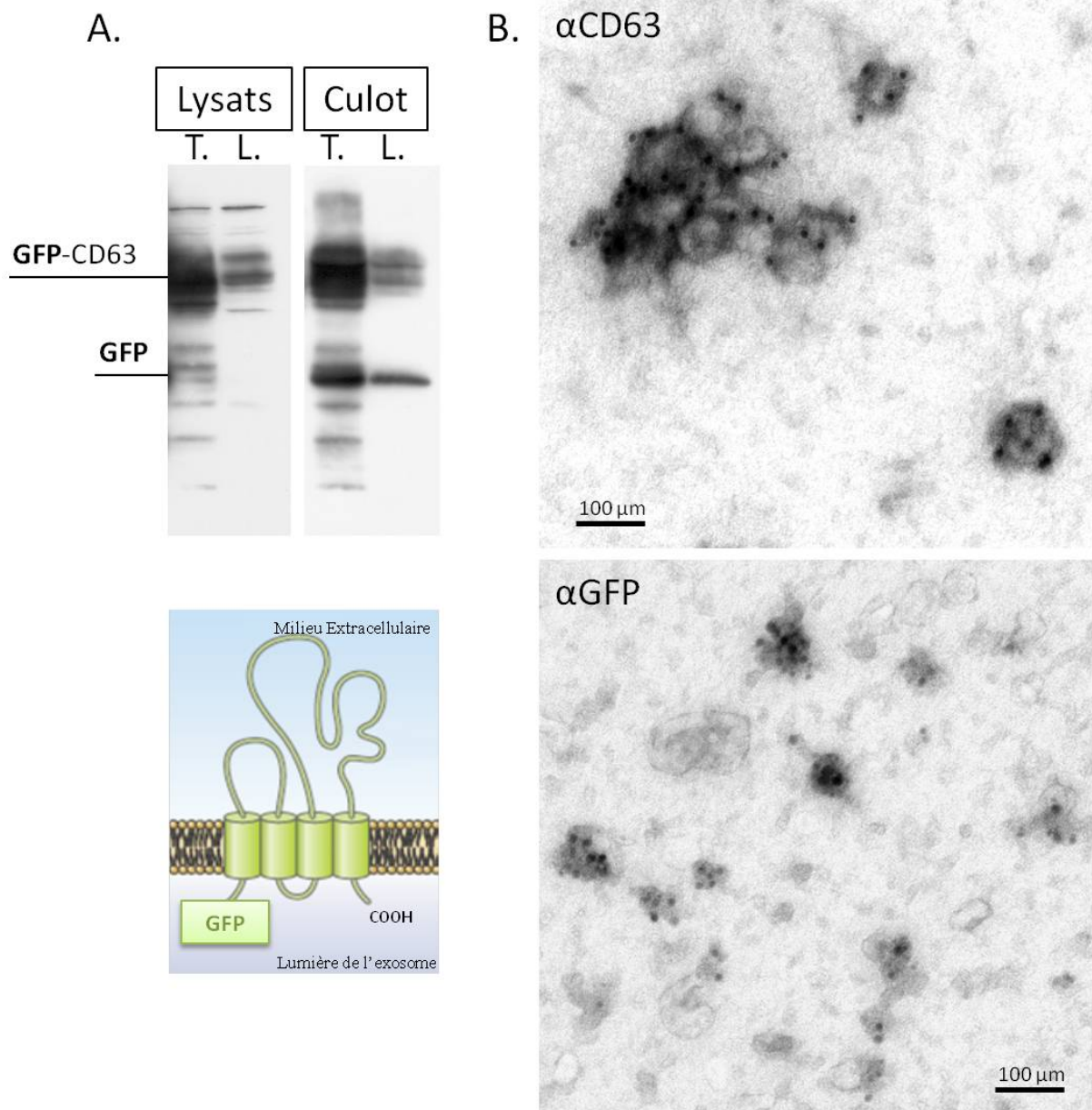


Figure 34 Caractérisation des exosomes de la lignée de N2a GFP-CD63. A) comparaison des cellules transfectées transitoirement (T) avec la lignée clonale établie (L). Les lysats cellulaires et les exosomes (culot 100 000 g) ont été analysés en Western blot à l'aide d'un anti-GFP. Dessous est schématisée la protéine de fusion telle qu'elle se présente à la membrane de l'exosome (adapté de (Levy and Shoham, 2005)). B) micrographes électroniques d'exosomes de la lignée N2a GFP-CD63. En haut, marquage immunogold avec un anticorps dirigé contre la tétraspanine CD63, en bas marquage immunogold pour la GFP sur des exosomes préalablement perméabilisés avant l'incubation de l'anticorps (F. Hemming).

3. Incubation sur des neurones en culture

L'un des principaux objectifs du laboratoire étant de prouver que les exosomes sont un moyen d'échange entre les cellules du SNC, nous avons utilisé notre lignée stable GFP-CD63 comme cellules donneuses et des neurones d'hippocampe en tant que cellules receveuses (réceptrices d'exosomes).

Des exosomes contenant GFP-CD63 ont été purifiés à partir de surnageants de culture et incubés à 37°C sur des lamelles portant des neurones d'hippocampe matures (≥ 14 DIV). Au bout d'une heure, les lamelles ont été plusieurs fois lavées puis fixées et examinées au microscope confocal à fluorescence.

Dans la **Figure 35** sont représentés pour un plan donné, les neurones observés en contraste interférentiel différentiel (ou DIC *Differential Interference Contrast*) et le signal GFP (**Figure 35a, b**). Lorsque l'on superpose les deux images, le signal GFP n'est pas distribué au hasard mais se situe sur les dendrites et le corps cellulaire. Il y a très peu de bruit de fond sur le substrat de culture, les exosomes GFP-CD63 se sont fixés préférentiellement sur les cellules (**Figure 35c**). Les neurones ainsi incubés présentent un marquage GFP ponctiforme dans le soma et le long des neurites. La taille d'un exosome isolé étant inférieure à la limite de détection du microscope, les points verts observés correspondent plutôt à des paquets d'exosomes GFP-CD63 fixés aux cellules.

Dans l'expérience présentée en **Figure 35**, les neurones ont été préalablement transfectés avec un plasmide codant pour la mCherry. La mCherry est une protéine fluorescente soluble qui colore le cytosol, permettant ainsi de visualiser le neurone transfecté. L'observation au microscope confocal permet d'examiner la fluorescence émise dans différents plans horizontaux définis selon un axe Z perpendiculaire à la surface de la lamelle. Des séries de sections optiques sont réalisées à travers l'objet permettant ainsi d'apprécier sa structure tridimensionnelle. Il nous est alors possible d'examiner si les exosomes ont été endocytés ou non. En récoltant des images le long de l'axe Z et selon un pas défini entre chaque plan, il est ensuite possible d'examiner chacun des plans individuellement ou de faire la projection des maxima. Dans chaque plan ($z = 1, z = 2$, etc) et pour chaque pixel est sélectionnée l'intensité maximale perçue. Les données sont collectées et projetées sur un même plan. On obtient alors une image entière de la cellule où chaque pixel est à son maximum d'intensité. Alors qu'une image prise dans un plan donné nous informera sur les exosomes présents dans ce plan, la projection des maxima permet de rendre compte de la morphologie du neurone dans son ensemble et de dénombrer tous les exosomes présents dans et sur ce neurone. Pour chaque figure présentant des images prises au microscope confocal, le procédé utilisé est précisé dans la légende de la figure.

La **Figure 35** montre un neurone transfecté mCherry selon les deux méthodes d'observation : dans un plan unique choisi au cœur du neurone (**Figure 35A-C**) et dans un plan avec projection des maxima (**Figure 35D-F**). Dans le plan unique pris au sein du neurone (**Figure 35C**), on distingue des exosomes qui décorent la surface neuronale mais également des exosomes qui ont été internalisés. Quant à la projection des maxima, elle nous permet de visualiser le neurone dans son ensemble (on distingue ses épines dendritiques) et tous les exosomes présents dans et sur ce neurone (**Figure 35F**).

Ces observations, réalisées sur un grand nombre de neurones, nous ont permis de conclure que les neurones mCherry présentaient à la fois des exosomes fixés à leur surface et des exosomes qui avaient été endocytés. Néanmoins, en répétant les expériences (n=20), nous avons constaté que l'internalisation des exosomes n'était pas systématique. Dans 45% des cas, des exosomes étaient présents à l'intérieur des neurones et à leur surface. 25% des expériences étaient en demi-teinte : il y avait majoritairement des exosomes fixés et très peu d'endocytose. Enfin, 30% de nos expériences montraient une fixation massive des exosomes mais pas d'endocytose. Dans les expériences où il nous a été donné d'observer des exosomes internalisés (n=9), nous avons cherché à mieux caractériser cette endocytose.

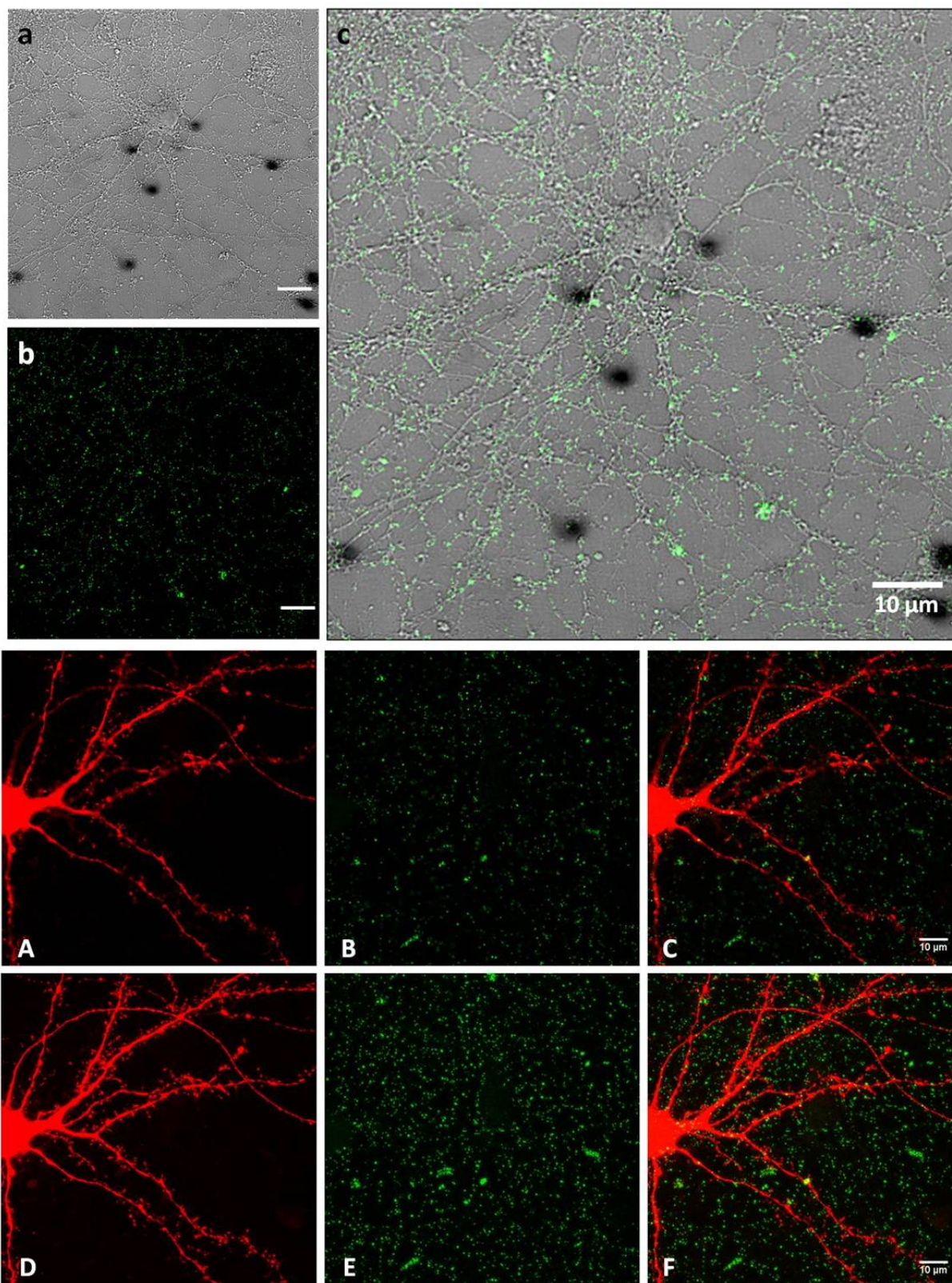


Figure 35 Les exosomes GFP-CD63 se fixent et sont internalisés par les neurones d'hippocampe (17 DIV). Des neurones transfectés mCherry ont été incubés 1h avec des exosomes GFP-CD63 (culot 100 000 g) puis lavés, fixés et observés en microscopie confocale. Panneau a-c) les exosomes se fixent préférentiellement aux cellules ; a) image DIC, b) signal GFP émis par les exosomes présents, c) les exosomes sont massivement localisés sur les neurones et absents du substrat de culture. Panneau A-F) la microscopie confocale permet deux types d'observation : A-C) le neurone transfecté mCherry observé dans un plan donné et les exosomes GFP-CD63 présents dans ce plan, D-E) projection des maxima, la morphologie du neurone apparaît clairement, tous les exosomes fixés et/ou internalisés sont repérés.

Suivi de l'internalisation des exosomes GFP-CD63 par des neurones en culture

En faisant varier les temps d'incubation, nous avons pu étudier le comportement des exosomes GFP-CD63 une fois fixés à la surface des neurones receveurs.

Nous avons tout d'abord constaté qu'une incubation de 10 minutes suffisait pour observer une fixation massive des exosomes GFP-CD63 sur les neurones naïfs transfectés mCherry (**Figure 36**). D'après nos observations, les exosomes de N2a GFP-CD63 ne semblent pas se fixer de manière privilégiée à un compartiment neuronal donné (dendrite/soma).

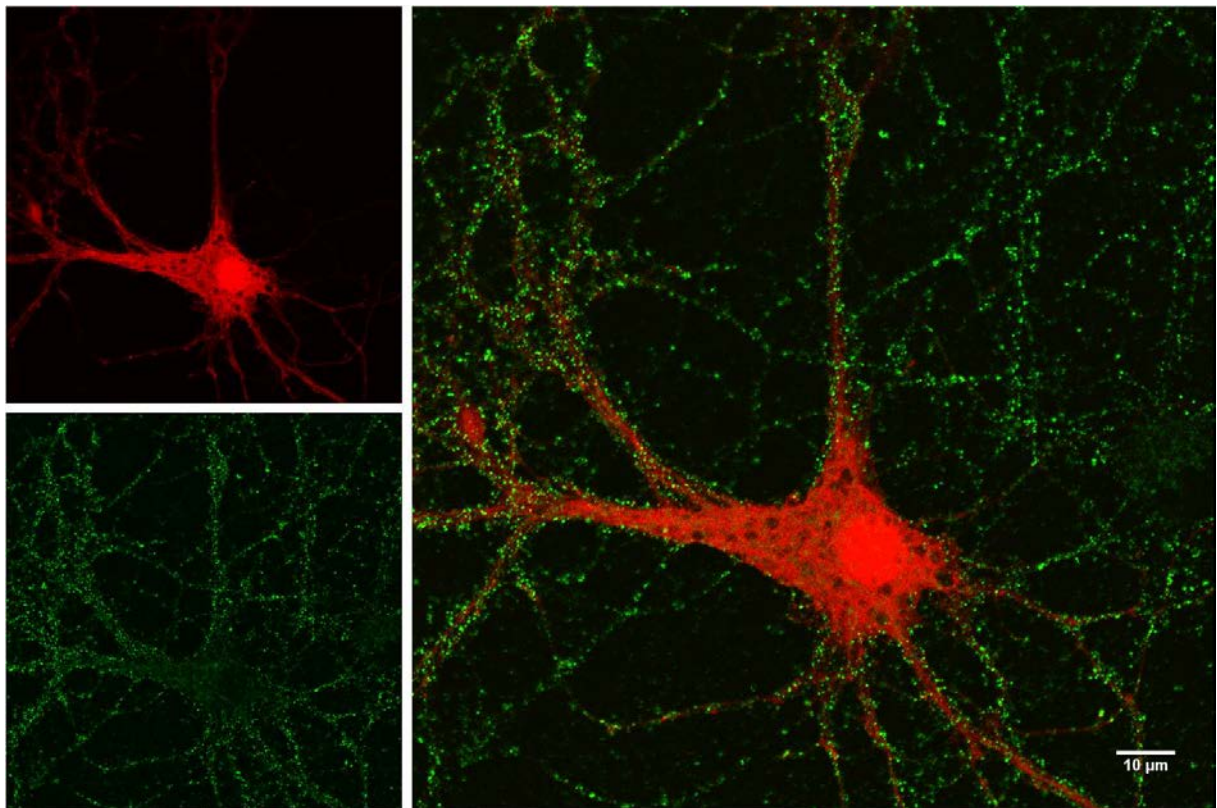


Figure 36 La fixation des exosomes GFP-CD63 sur les neurones hippocampiques est un phénomène extrêmement rapide. Des exosomes de N2a GFP-CD63 ont été culottés à 100 000 g, resuspendus dans du milieu conditionné de neurones et incubés pendant 10 min sur des neurones d'hippocampe (14DIV) transfectés mCherry. Microscopie confocale, image dans un plan donné.

Nous avons par ailleurs cherché à visualiser les extrémités pré-synaptiques des neurones en réalisant un immunomarquage de la synaptophysine. Nous n'avons observé aucune colocalisation entre les parties pré-synaptiques neuronales et les exosomes GFP-CD63 (**Figure 37**). Nous nous sommes également demandé si les exosomes GFP-CD63 se fixaient à toutes les cellules en présence. En effet, l'emploi d'AraC (cytosine-bêta-D-arabinose) dans nos cultures de neurones primaires limite la prolifération des cellules gliales. Néanmoins, cela ne permet pas leur éradication totale et les cellules gliales représentent 1 à 2% de la population cellulaire. En plus de nos observations sur des neurones transfectés mCherry, nous avons utilisé du WGA (wheat germ agglutinin) pour délimiter les contours de toutes les cellules incubées. L'emploi de la lectine WGA couplée au fluorochrome Alexa Fluor 594 (Invitrogen) permet de colorer les glycoprotéines et les glycolipides membranaires. Incubé à 4°C pendant 2 minutes, le WGA permet de marquer en rouge la membrane plasmique (le froid empêchant son internalisation). Nous avons repéré les astrocytes présents dans notre culture grâce à une immunofluorescence dirigée contre la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein). Comme nous le montre la **Figure 38**, les exosomes incubés sur ces lamelles se fixent aux astrocytes présents dans la culture (**Figure 38, zoom**).

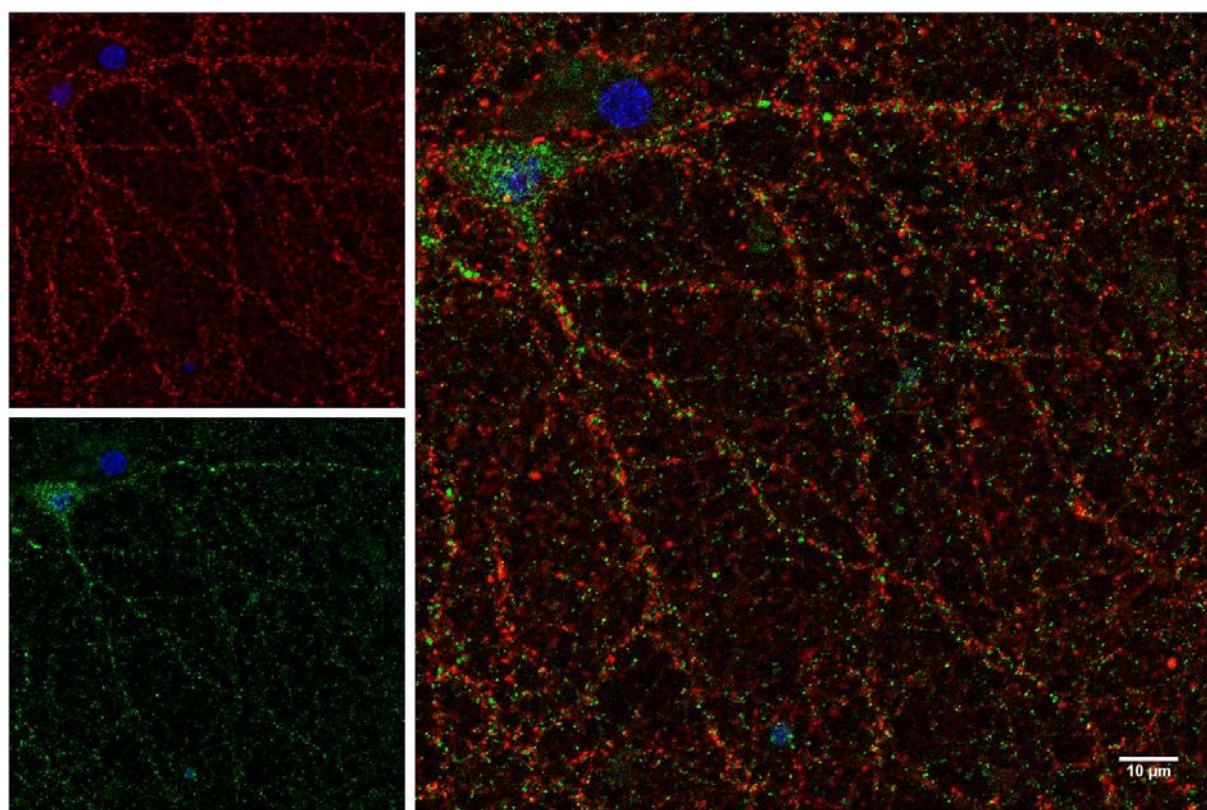


Figure 37 Les exosomes GFP-CD63 ne se fixent pas aux extrémités pré-synaptiques des neurones d'hippocampe. Des exosomes de N2a contenant la GFP-CD63 (culot 100 000 g) ont été incubés pendant 10 minutes sur des neurones d'hippocampe à 17DIV. Ces derniers ont ensuite été lavés et remis dans leur milieu conditionné pendant 20 minutes (chasse). Puis, les cellules ont été lavées, fixées et les compartiments pré-synaptiques repérés en immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre la synaptophysine (en rouge). Microscopie confocale, image dans un plan donné.

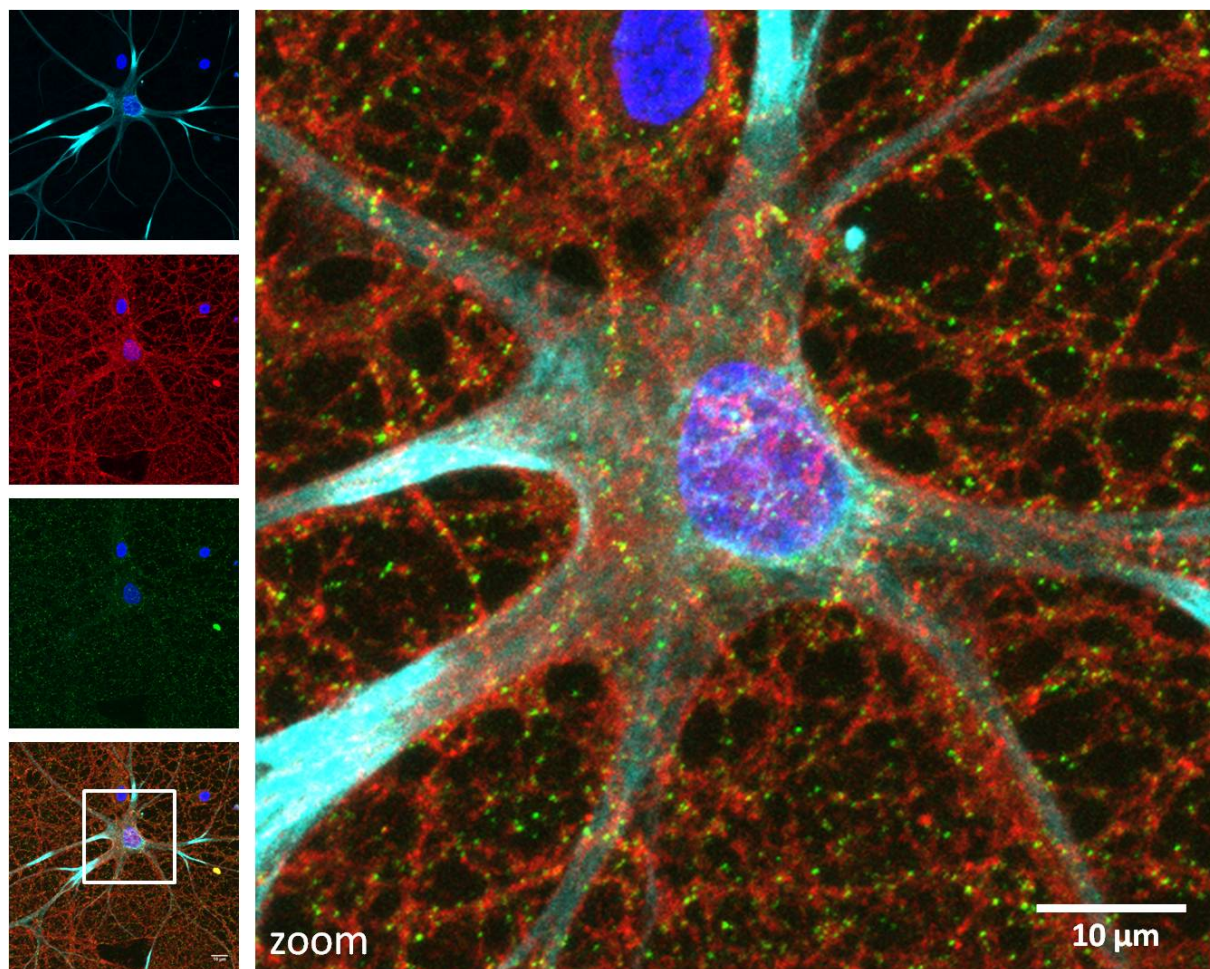


Figure 38 Les exosomes GFP-CD63 se fixent aux cellules gliales présentes dans la culture. Des exosomes de N2a GFP-CD63 (culot 100 000 g) ont été incubés pendant 10 minutes sur une culture de neurones d'hippocampe (17DIV). Les cellules ont ensuite été lavées et remises dans leur milieu conditionné pendant 20 minutes (chasse). Puis, les membranes cellulaires ont été colorées au WGA-Alexa fluor 594 (2min à 4°C). Les cellules ont été lavées, fixées et les astrocytes repérés en immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre la GFAP (en cyan). Microscopie confocale, projection des maxima.

Par la suite, nous nous sommes focalisés sur la recapture des exosomes GFP-CD63 par les neurones. Après une incubation de 10 minutes des exosomes suivie d'une chasse de 20 minutes, on remarque la présence de compartiments intracellulaires GFP-positifs (**Figure 39**). Bien délimité grâce au WGA associé à la membrane plasmique, le cytosol semble contenir plusieurs compartiments présentant une fluorescence GFP qui ne peut être attribuée qu'aux exosomes GFP-CD63 (**Figure 39**). Ces compartiments internes ne ressemblent pas au marquage ponctiforme observé lorsque des agrégats d'exosomes se fixent à la membrane des cellules (**Figure 36 et Figure 38**). Il s'agit de structures vésiculaires plus grandes en taille et avec une fluorescence un peu plus diffuse que les points observés à la surface des cellules.

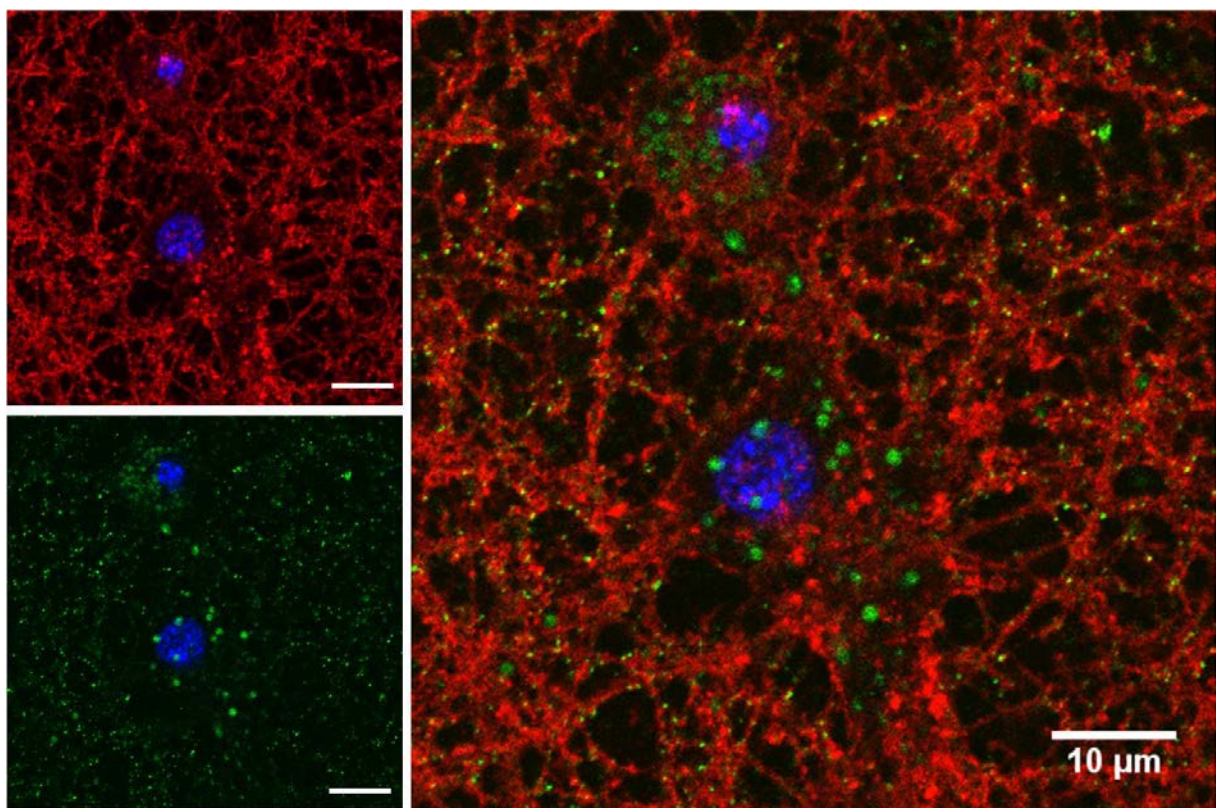


Figure 39 Les exosomes GFP-CD63 sont internalisés par les neurones en culture. Des exosomes de N2a GFP-CD63 (culot 100 000 g) ont été incubés pendant 10 minutes sur une culture de neurones d'hippocampe (17DIV). Les cellules ont ensuite été lavées et remises dans leur milieu conditionné pendant 20 minutes (chasse). Puis, les membranes cellulaires ont été colorées au WGA-Alexa fluor 594 (2min à 4°C). Les lamelles ont été lavées, fixées et observées en microscopie confocale (image dans un plan donné).

Il nous a été possible d'observer des compartiments similaires pour des temps plus longs (40 min, 60 min), à chaque fois localisés dans le cytosol du neurone receveur. En marquant les endosomes tardifs et les lysosomes avec un anticorps dirigé contre la protéine Lamp1, nous avons constaté que les structures GFP-positives côtoyaient les compartiments Lamp1-positifs sans pour autant repérer de colocalisations entre ces deux marquages (Figure 40). Nous avons alors réalisé des immunofluorescences dirigées contre différents marqueurs de compartiments de la voie endocytaire : EEA1 pour repérer les endosomes précoces, LBPA majoritairement associé aux MVE, le récepteur à la transferrine pour marquer les endosomes de recyclage et enfin Lamp1 pour les lysosomes. Malgré la diversité de ces marquages, associée à des *timings* d'incubation différents, il nous a été impossible d'observer la moindre colocalisation entre les compartiments fluorescents verts et les compartiments de la voie endocytaire classique.

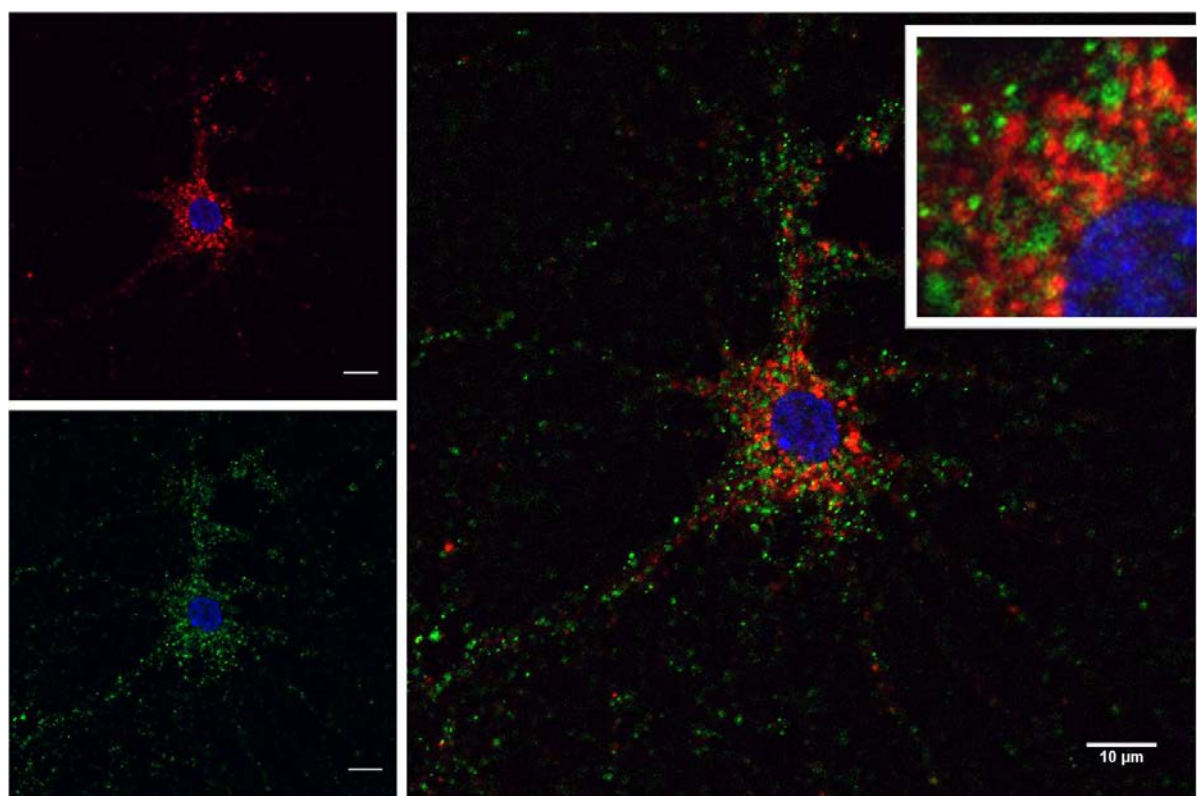


Figure 40 Les exosomes GFP-CD63 se retrouvent dans des compartiments intracellulaires qui côtoient les lysosomes. Des exosomes de N2a GFP-CD63 ont été culottés à 100 000 g, resuspendus dans du milieu conditionné de neurones et incubés pendant 40 min sur des neurones d'hippocampe (17DIV). Les cellules ont ensuite été lavées, fixées et les lysosomes repérés en immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre Lamp1 (en rouge). Microscopie confocale, image dans un plan donné.

Enfin, au bout de trois heures d'incubation, les neurones ne présentent plus de compartiments GFP-positifs semblables à ceux observés pour des temps inférieurs (Figure 39 et Figure 40) mais une fluorescence verte concentrée dans de plus petites structures. La figure 11 en est un exemple : on y voit de petites vésicules rondes vertes à proximité d'endosomes précoces (Figure 41A) ou tardifs (Figure 41B) en rouge sans superposition des signaux.

L'ensemble de ces résultats montre que les exosomes de N2a GFP-CD63 peuvent être recapturés par des neurones naïfs et subissent un trafic intracellulaire qui ne passe pas par des compartiments de la voie endocytaire dite «classique». Des expériences similaires réalisées pour de la microscopie électronique nous permettraient de repérer les exosomes GFP-CD63 à la surface neuronale ainsi que dans les différents compartiments intracellulaires dans lesquels ils se retrouvent. Nos observations permettent d'envisager sérieusement l'implication des exosomes dans la dissémination et l'échange de protéines entre cellules du SNC.

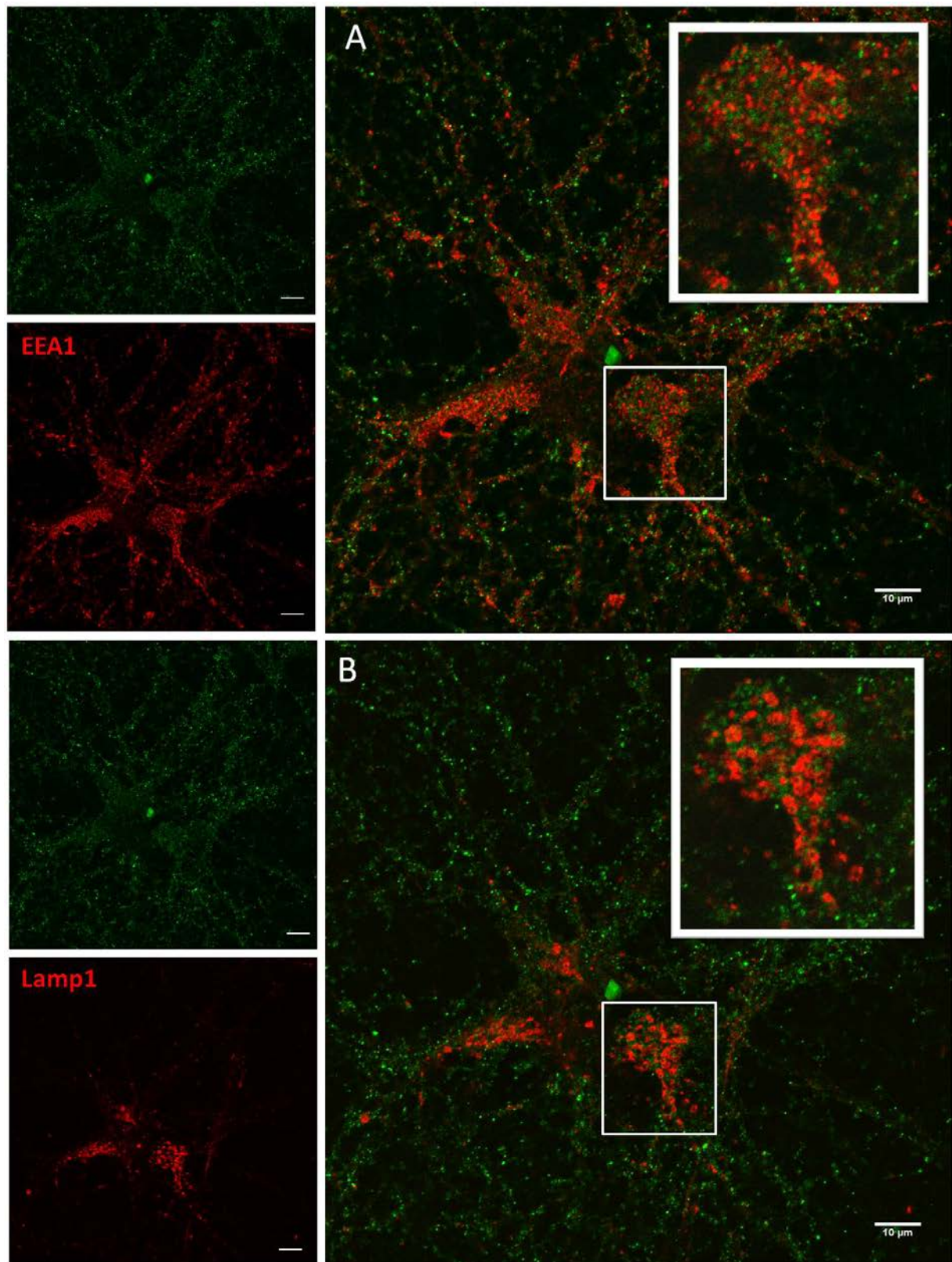


Figure 41 Les exosomes GFP-CD63 semblent subir un trafic intracellulaire indépendant des compartiments endosomaux « classiques ». Des exosomes de N2a GFP-CD63 ont été culottés à 100 000 g, resuspendus dans du milieu conditionné de neurones et incubés pendant 180 min sur des neurones d'hippocampe (17DIV). Les cellules ont ensuite été lavées, fixées et les endosomes précoces repérés en immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre EEA1 (panneau A) et les lysosomes avec un anti-Lamp1 (panneau B). Microscopie confocale, image dans un plan donné.

II. La toxine du tétanos

La toxine du tétanos (TeNT) passe du motoneurone à l'interneurone selon un mécanisme encore méconnu. Or, la sortie de la GFP-TTC associée aux exosomes neuronaux laisse penser que ces derniers pourraient être le moyen pour la TeNT de passer de neurone en neurone. Nous avons cherché à vérifier que les exosomes transportant la TTC peuvent effectivement être recaptés par des neurones receveurs. Les neurones corticaux sont utilisés comme cellules donneuses d'exosomes et les neurones d'hippocampe, comme cellules receveuses.

A la suite de la stimulation de la sortie des exosomes, les surnageants des neurones corticaux préalablement incubés avec la GFP-TTC sont récoltés. Le culot 100 000 g est déposé sur un gradient continu de sucrose. Les trois fractions dont la densité est comprise entre 1,1 et 1,15 g/mL sont reprises. Les exosomes contenus dans ces trois fractions sont culottés, repris dans du milieu conditionné de neurones et incubés sur des neurones hippocampiques.

1. Les exosomes GFP-TTC se fixent et sont internalisés par les neurones

Les exosomes portant la GFP-TTC sont incubés à 37°C sur des lamelles portant des neurones d'hippocampe placées en chambre humide. Au bout d'une heure d'incubation, un marquage GFP très ponctué est visible presque exclusivement sur les neurites et le corps cellulaire des neurones. Comme pour les exosomes GFP-CD63 de N2a, la taille relativement importante des points laisse penser qu'il s'agit de paquets d'exosomes véhiculant la GFP-TTC (Figure 42).

Pour déterminer la localisation subcellulaire des exosomes GFP-TTC, les neurones receveurs ont été préalablement transfectés avec le plasmide codant pour la protéine fluorescente mCherry et observés au microscope confocal. Les nombreux points GFP observés correspondent certainement à des agrégats d'exosomes qui se sont fixés et/ou qui ont été endocytés par les neurones receveurs. Les neurites de ces derniers sont décorées par les exosomes GFP-TTC qui paraissent fixés à intervalle régulier le long de ces prolongements cellulaires. Une fois internalisés, les exosomes sont retrouvés majoritairement au niveau du soma (Figure 43).

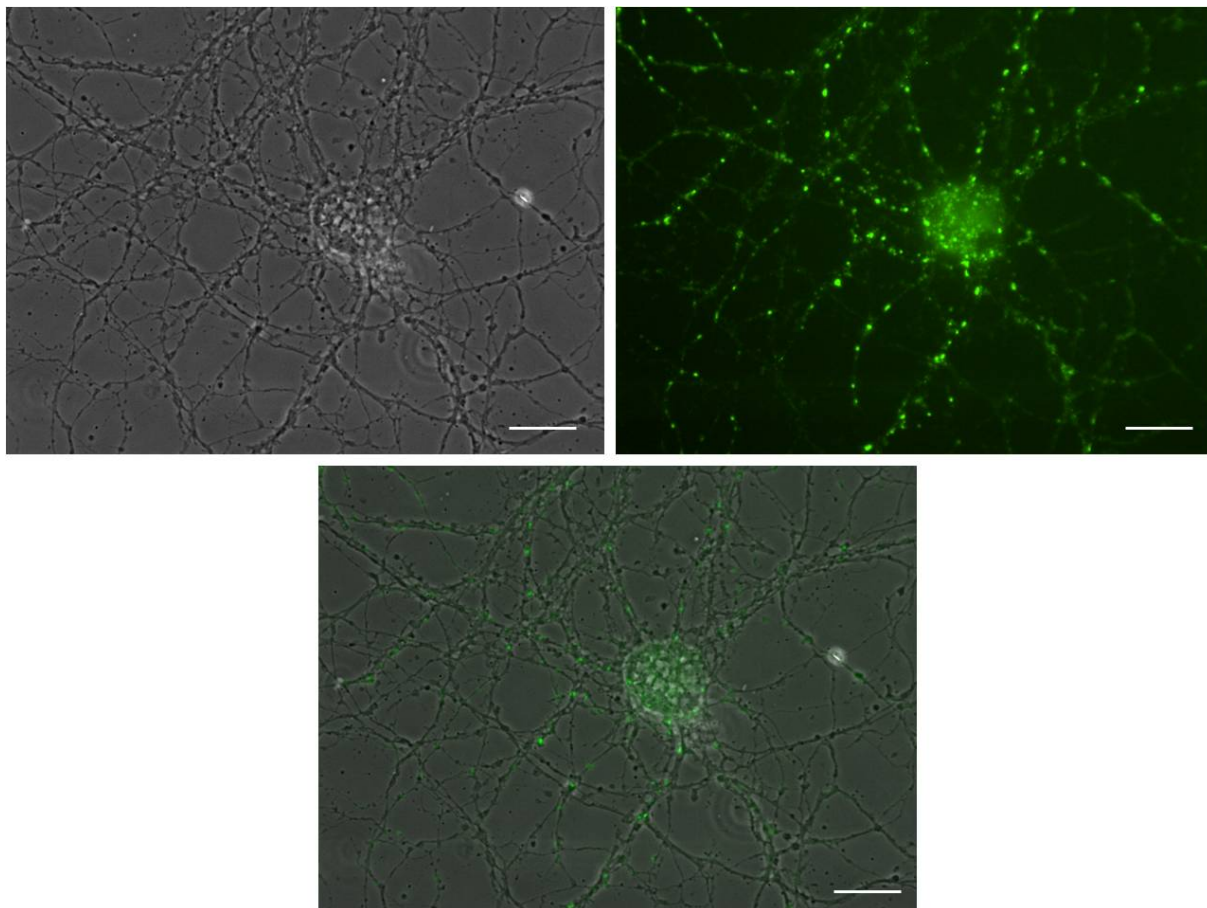


Figure 42 Les exosomes véhiculant la GFP-TTC se fixent aux neurones en culture. Des neurones d'hippocampe âgés de 9DIV ont été incubés 1h avec des exosomes sécrétés par des neurones corticaux préalablement incubés avec de la GFP-TTC. Les exosomes GFP-TTC ont été purifiés sur gradient continu de sucrose. Microscopie à fluorescence, 100X ; en haut à gauche, cellules observées en contraste de phase ; à droite, exosomes GFP-TTC, en bas, superposition des deux images. Bar : 10 μ m.

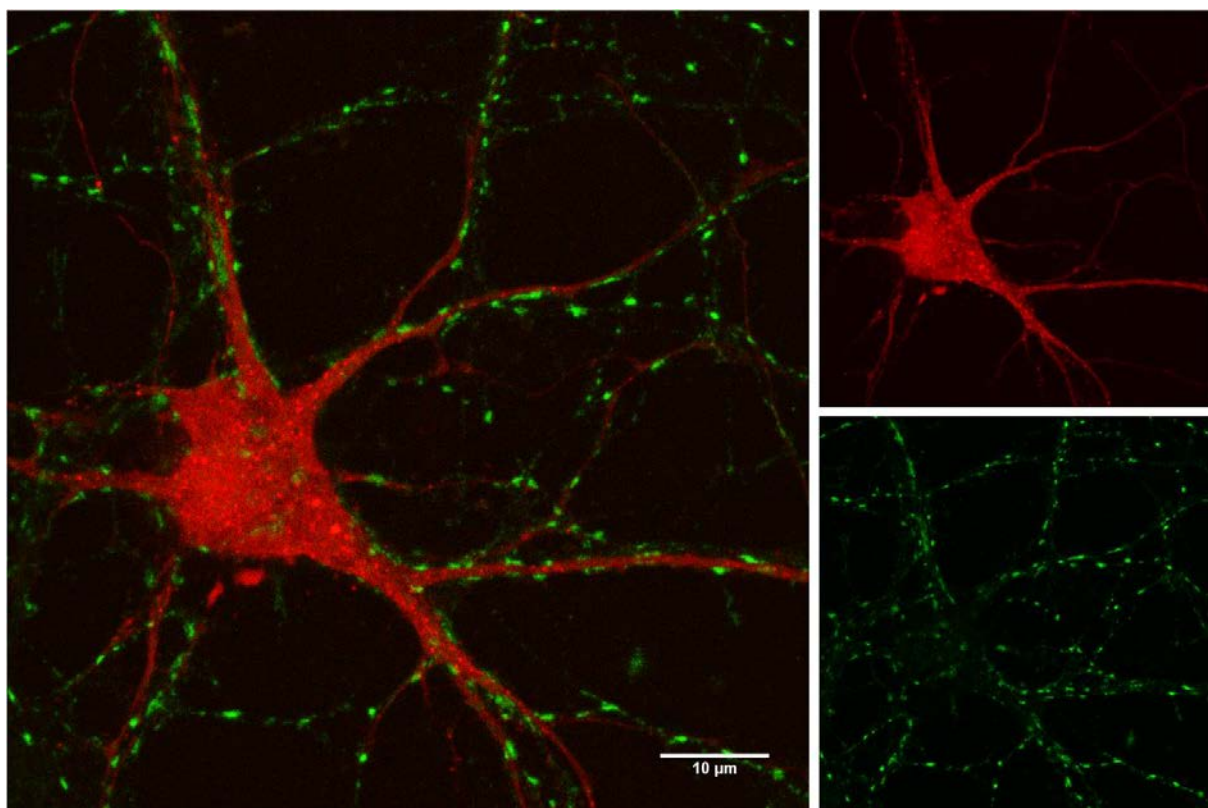


Figure 43 Les exosomes GFP-TTC se fixent et sont internalisés par les neurones receveurs. Des exosomes sécrétés par des neurones corticaux préalablement incubés avec de la GFP-TTC ont été purifiés sur gradient continu de sucrose et incubés pendant 1h sur des neurones d'hippocampe (16DIV) transfectés mCherry. Microscopie confocale, sommation de trois plans choisis au cœur du neurone (substack maker, Image J).

Dans la **Figure 44**, les neurones ont été mis en présence de WGA-Alexa Fluor 594 pendant 10 min à 37°C puis lavés et incubés 1h avec des exosomes véhiculant la GFP-TTC. Cette étape de coloration préalable permet une internalisation progressive du WGA. Observés dans un plan donné, certains amas d'exosomes GFP-TTC forment des points verts à la surface du neurone, d'autres apparaissent jaunes lorsqu'ils se superposent au WGA rouge membranaire (**Figure 44A, flèches**). Il est également possible d'observer des structures cytoplasmiques marquées au WGA contenant de la fluorescence GFP et ce, surtout au niveau du corps cellulaire (**Figure 44A, encadré**). La projection des maxima permet de rendre compte de la spécificité de fixation et d'endocytose de tous les exosomes GFP-TTC sur les neurones en présence (**Figure 44B**).

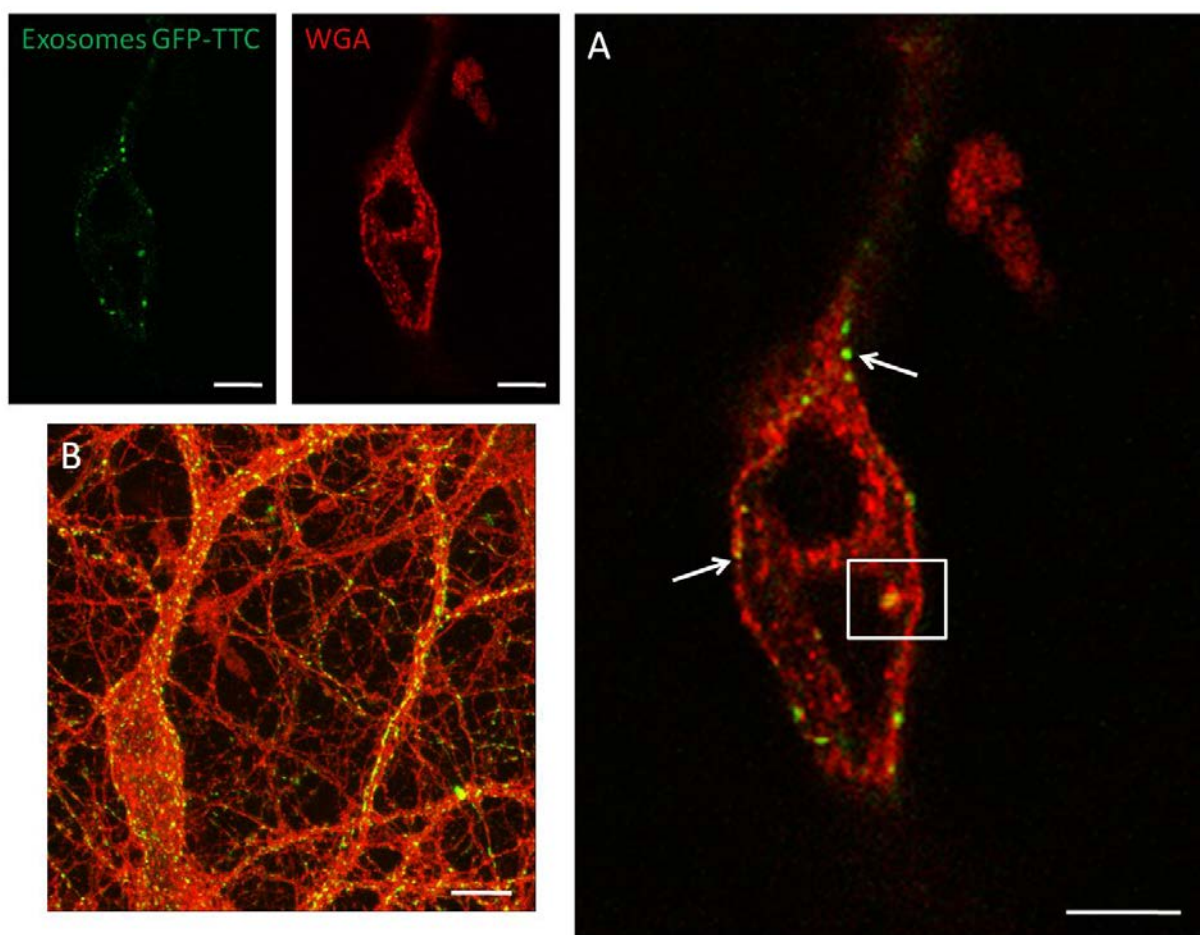


Figure 44 Fixation et internalisation d'exosomes GFP-TTC sur des neurones préalablement colorés au WGA. Des neurones corticaux ont été incubés avec de la GFP-TTC et leurs exosomes purifiés sur gradient de sucrose. L'incubation des exosomes GFP-TTC a été précédée d'une coloration au WGA 10 min à 37°C pour permettre au colorant d'être internalisé. A) observation au microscope confocal dans un plan donné d'un corps cellulaire neuronal présentant à la fois des paquets d'exosomes fixés (flèches) et internalisés (encadré) ; B) vue d'ensemble avec projection des maxima. Bar : 10 μ m.

Les observations au microscope confocal couplé à différentes techniques de visualisation des neurones receveurs nous ont donc permis d'apporter la preuve que des exosomes neuronaux véhiculant la GFP-TTC peuvent se fixer et être internalisés par des neurones d'hippocampe naïfs.

Cependant, lorsque l'on analyse la position des exosomes GFP-TTC sur les neurones incubés, il est parfois difficile de conclure quant à leur internalisation ou non. Pour y remédier, nous avons tenté de mettre au point un protocole d'incubation d'exosomes suivie de bains acides pour débarrasser les neurones receveurs des exosomes uniquement fixés (non endocytés) mais cette technique délicate provoquait une mort neuronale massive et a dû être abandonnée. Toujours dans l'idée de se focaliser sur les exosomes internalisés, nous avons alors travaillé avec de la TTC couplée à la HRP (Horseradish Peroxydase). La protéine HRP-TTC est obtenue par couplage *in vitro* de la TTC à la peroxydase du raifort (HRP). Tout comme la GFP-TTC, qui, elle, est une protéine de fusion, la TTC-HRP est capable de se fixer aux neurones et d'être internalisée. Des neurones corticaux ont été incubés avec de la TTC-HRP puis leurs exosomes ont été purifiés sur gradient de sucrose et incubés pendant 1h sur des neurones hippocampiques. Pour visualiser la HRP-TTC transportée via les exosomes, on utilise l'activité enzymatique oxydative de la HRP pour précipiter un chromogène, le DAB (3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride). En présence d'acide ascorbique, ce dernier est préférentiellement oxydé par rapport au DAB. En revanche, l'acide ascorbique ne passe pas les membranes cellulaires donc il entre en compétition avec le DAB uniquement à l'extérieur des neurones. Seul le DAB interne est précipité (couleur sombre) : seuls les exosomes HRP-TTC internalisés sont visualisés (Figure 45, flèches). En permettant de ne visualiser que les exosomes internalisés, cette expérience confirme les observations des expériences précédentes qui montrent une localisation préférentiellement somatique des exosomes endocytés.

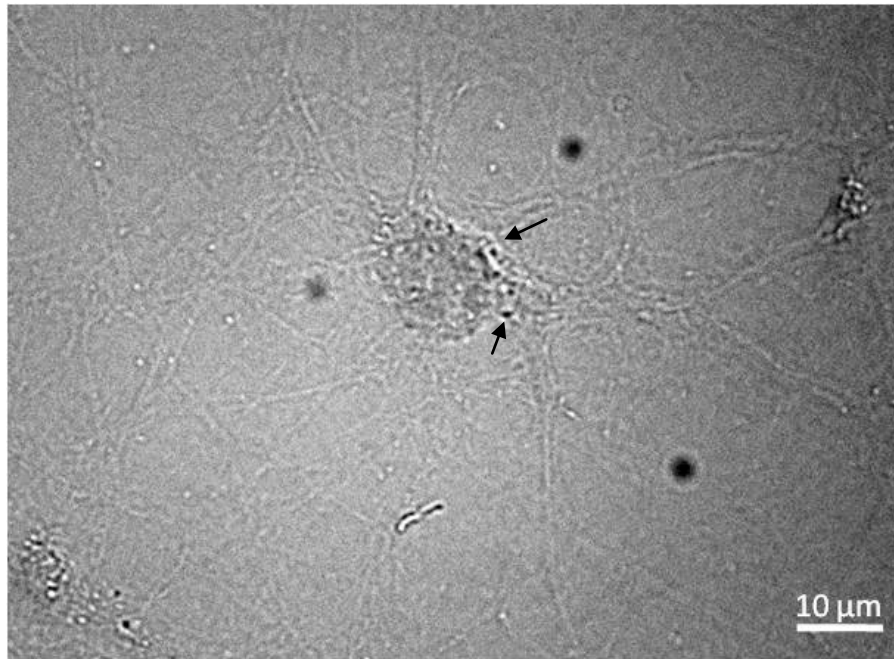


Figure 45 Visualisation des exosomes véhiculant la TTC couplée à la HRP qui ont été internalisés par les neurones. Des neurones corticaux ont été incubés 1h avec de la TTC couplée à la HRP (peroxydase du raifort), leurs surnageants ont été récupérés et leurs exosomes concentrés sur gradient continu de sucrose. Des neurones hippocampiques (16 DIV) ont été incubés 1h avec les exosomes transportant la TTC-HRP. La révélation de l'activité de la peroxydase s'est faite en présence d'acide ascorbique, substrat compétitif du DAB mais qui est incapable de traverser les membranes cellulaires. Les grains noirs observés (flèches) correspondent à du DAB précipité par de la HRP associée aux exosomes qui ont été internalisés.

2. Les exosomes portant la GFP-TTC présentent une spécificité de fixation intercellulaire

A un stade de culture avancé, les neurones hippocampiques âgés de plus de 14 DIV ont développé un réseau neuritique très dense. Nos observations précédentes nous ont permis de constater que les exosomes se fixent préférentiellement aux cellules et n'adhèrent pas au substrat de culture. Lorsque l'on examine les enchevêtrements de neurites colorées au WGA rouge, on constate que tous les neurones ne sont pas marqués de points verts ([Figure 46A](#)).

En multipliant les observations, il nous est apparu que les exosomes transportant la GFP-TTC ne se fixent pas à tous les neurones présents sur la lamelle incubée. Nous avons fait le même constat lors de l'incubation de GFP-TTC seule à plus faible concentration que celle utilisée pour obtenir des exosomes GFP-TTC. A l'issue d'une incubation avec des protéines de fusion GFP-TTC à la concentration de 288 pM (au lieu de 36 nM), tous les neurones ne présentent pas de marquage GFP (données non montrées). Il semblerait donc que les exosomes portant la GFP-TTC présentent une spécificité de fixation interneuronale comparable à celle observée lorsque l'on incube la GFP-TTC seule sur des neurones naïfs.

L'emploi d'AraC limite la prolifération des cellules gliales dans nos cultures de neurones primaires. Sur des lamelles non traitées à l'AraC, les cellules gliales sont nombreuses et forment un substrat de choix pour la pousse neuritique des neurones. L'incubation d'exosomes GFP-TTC sur de telles lamelles montre la fixation et l'internalisation préférentielle sur les neurones. Une coloration au WGA-Alexa Fluor 594 à 4°C pendant 2 minutes (pour empêcher une internalisation de ce colorant et ne marquer que les membranes plasmiques) permet de repérer les cellules gliales aplaties sur le substrat de culture et montre bien que les exosomes ne se fixent pas à ces cellules. ([Figure 46B](#)). Une immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre la GFAP nous a permis de constater que les exosomes véhiculant la GFP-TTC ne se fixent pas aux astrocytes. ([Figure 47](#)). Bordet *et al* avaient utilisé le même type d'immunomarquage pour démontrer la très forte affinité et spécificité de l'extrémité C-terminale de la chaîne lourde de la TeNT pour les neurones ([Bordet et al., 2001](#)).

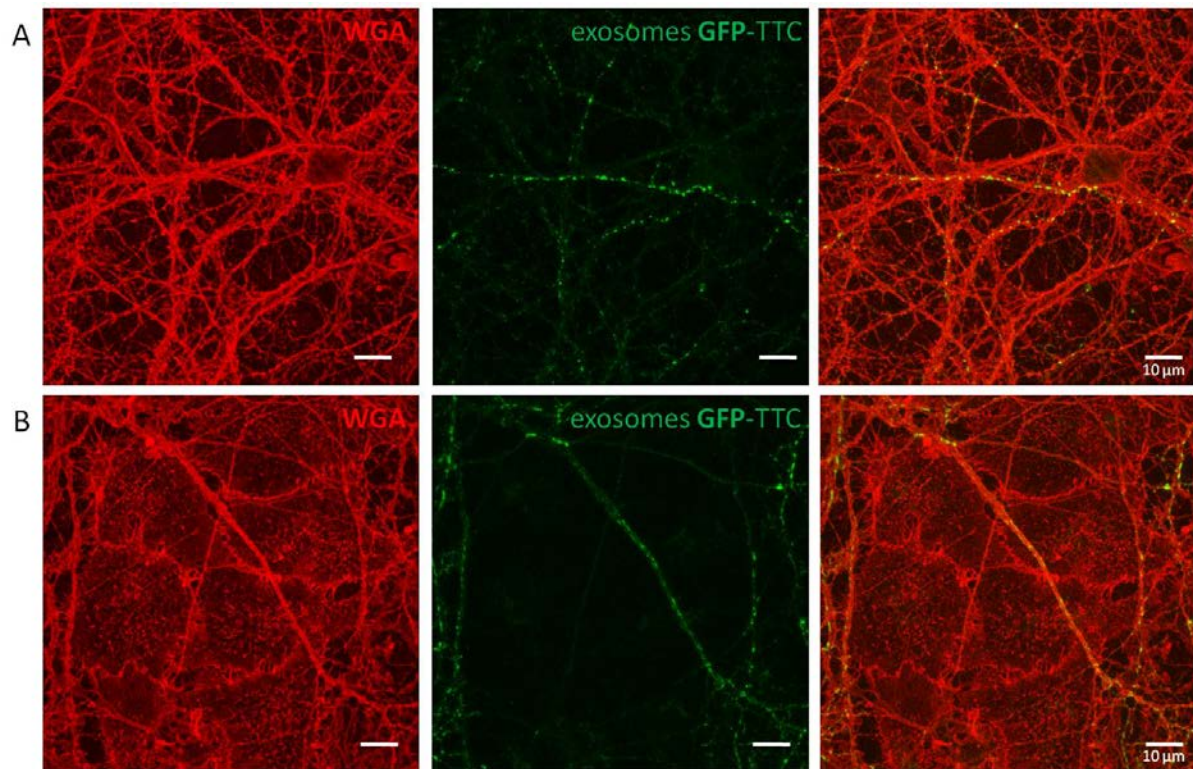


Figure 46 Les exosomes transportant la GFP-TTC ne se fixent pas à toutes les cellules présentes dans la culture. Des exosomes sécrétés par des neurones corticaux préalablement incubés avec de la GFP-TTC ont été purifiés sur gradient continu de sucrose et incubés pendant 1h sur des neurones d'hippocampe (16DIV). Les membranes cellulaires ont été colorées avec du WGA-Alexa fluor 594 (2 min, à 4°C). A) les exosomes GFP-TTC ne se fixent pas à tous les neurones. Certaines neurites sont décorées par de nombreux points verts, d'autres pas du tout ; B) les exosomes GFP-TTC ne se fixent pas aux cellules gliales. Dans une culture non traitée à l'Ara-C, des cellules gliales tapissent le substrat de culture. Alors que les neurones environnants présentent des paquets d'exosomes fixés sur leurs neurites, les cellules gliales apparaissent dépourvues de marquage GFP.

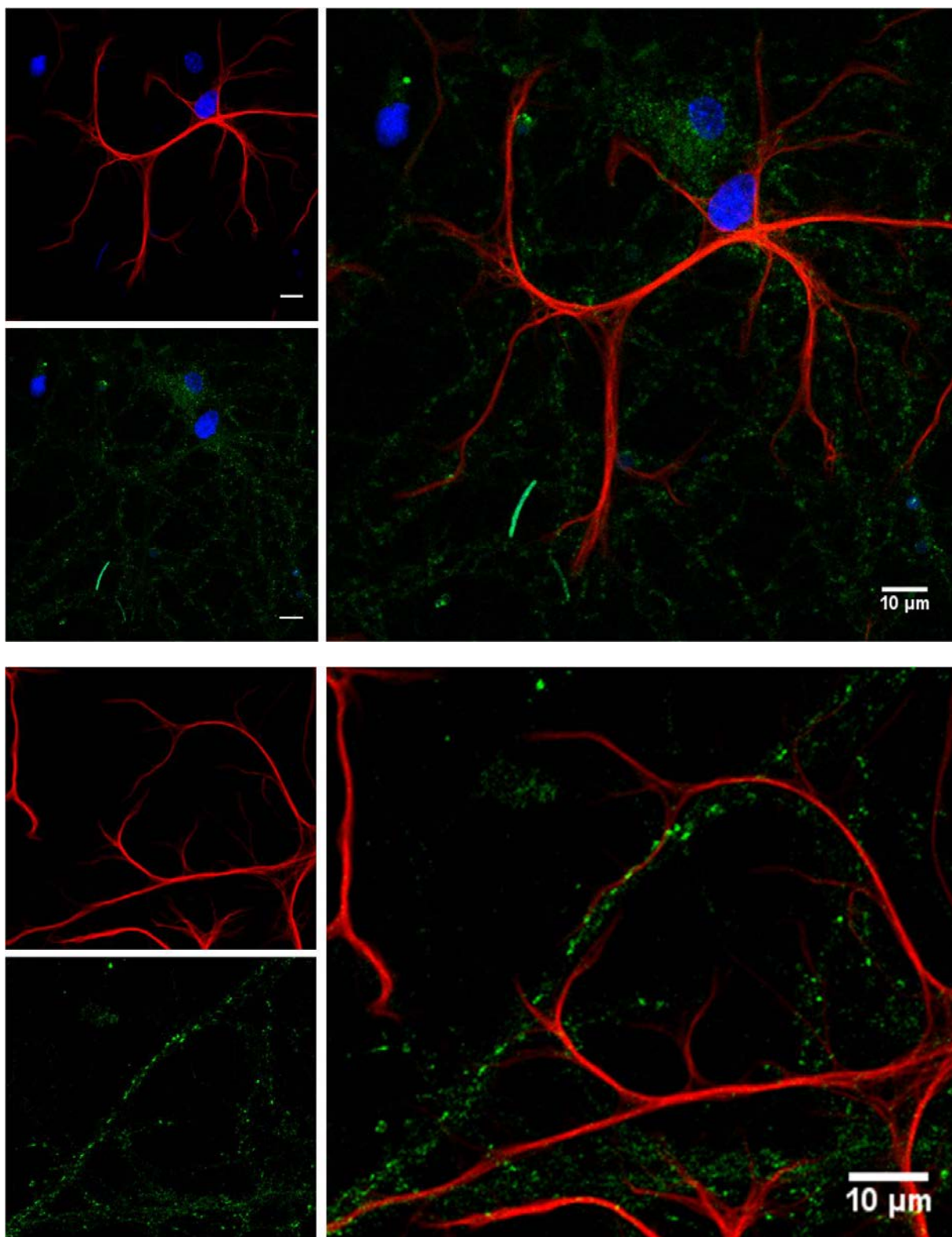


Figure 47 Les exosomes GFP-TTC ne se fixent pas aux astrocytes. Des neurones corticaux ont été incubés 1h avec de la GFP-TTC, leurs exosomes ont été récupérés et séparés sur gradient continu de sucrose. Les exosomes véhiculant la GFP-TTC ont été incubés 1h sur une culture de neurones d'hippocampe (22DIV). Les astrocytes présents dans la culture ont été repérés en immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre la GFAP (en rouge). Microscopie confocale, image dans un plan donné.

Il semblerait donc que le devenir des exosomes neuronaux puisse être influencé par le cargo qu'ils portent à leur surface. Ainsi les exosomes transportant la GFP-TTC présentent une spécificité de fixation intercellulaire. Comme la toxine du tétanos dont la GFP-TTC reproduit le comportement, les exosomes GFP-TTC ne se fixent pas à tous les neurones en culture et surtout ils n'ont aucune affinité pour les cellules gliales. Nous nous sommes alors demandé si les exosomes portant la GFP-TTC se fixaient préférentiellement aux extrémités pré-synaptiques comme cela est le cas pour la toxine entière.

3. Les exosomes portant la GFP-TTC présentent une spécificité de fixation subcellulaire

En accord avec la littérature (Matteoli et al., 1996), nous avons montré plus haut que la GFP-TTC se fixe au niveau des parties pré-synaptiques des neurones hippocampiques et corticaux (cf. Article 1, données supplémentaires). Des immunomarquages sur des neurones ayant été incubés avec des exosomes GFP-TTC, montrent que le signal GFP colocalise souvent, mais pas exclusivement, avec celui de la synaptophysine (Figure 48A). Dans le cas de PSD95, on observe souvent une juxtaposition mais jamais de superposition du marquage PSD95 avec les exosomes GFP-TTC (Figure 48B). Ces observations montrent donc que les exosomes porteurs de l'extrémité C-terminale de la chaîne lourde de la TeNT se fixent de façon préférentielle aux extrémités pré-synaptiques des neurones naïfs. Cette fixation subcellulaire caractéristique de la GFP-TTC laisse penser que la voie d'entrée des exosomes neuronaux peut être modifiée par une protéine pathogène portée à leur surface telle que la TeNT.

Les exosomes véhiculant la TTC ne se comportent pas comme les exosomes de N2a GFP-CD63. Nous avons en effet constaté que ces derniers peuvent se fixer et être internalisés par des cellules gliales présentes dans la culture (cf. Figure 38). De surcroît, lorsque des exosomes GFP-CD63 se fixent aux neurones, nous n'avons pas remarqué de colocalisations entre le signal GFP de ces vésicules et les extrémités pré-synaptiques marquées grâce à une immunofluorescence dirigée contre la synaptophysine (cf. Figure 37).

Les modes de fixation des exosomes GFP-CD63 et des exosomes GFP-TTC diffèrent donc sur plusieurs points. Les exosomes portant la GFP-TTC semblant réellement reproduire le comportement de la toxine seule, nos expériences suggèrent donc que la fixation des exosomes est influencée par leurs cargos. Il nous faudrait maintenant comparer le comportement de ces exosomes neuronaux à d'autres exosomes fluorescents sécrétés par des neurones et non par des N2a.

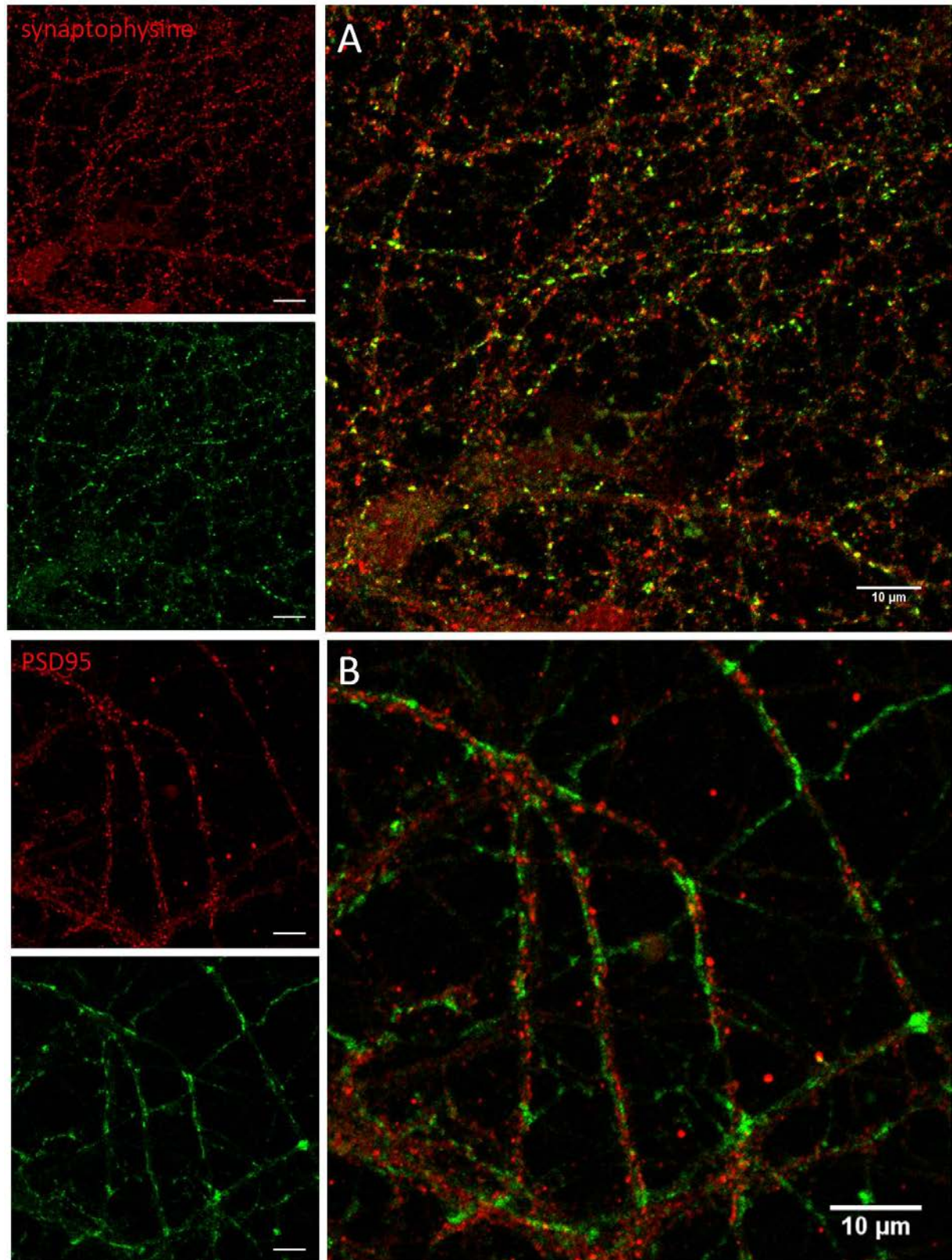


Figure 48 Les exosomes véhiculant la GFP-TTC se fixent préférentiellement aux extrémités pré-synaptiques. Des exosomes contenant la GFP-TTC ont été incubés 1h sur des neurones d'hippocampe à 22 DIV. Les cellules ont ensuite été lavées, fixées et soumises à une immunofluorescence. A) les exosomes GFP-TTC colocalisent majoritairement avec la synaptophysine (IF, en rouge) ; B) les exosomes GFP-TTC ne se fixent pas aux extrémités post-synaptiques repérées avec un anti-PSD95 (IF, en rouge). Microscopie confocale, sommation de trois plans choisis au cœur du neurone (substack maker, Image J).

III. ARN exosomaux

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans une démarche de compréhension des rôles possibles joués par les exosomes neuronaux dans le SNC. Dans cette optique, je me suis intéressée au contenu en ARN des exosomes de N2a et de neurones corticaux en culture.

1. Analyse du contenu en ARN des exosomes de N2a

Nous avons démarré une collaboration avec un laboratoire lyonnais (ProfilXpert dirigé par J. Lachuer) afin de démontrer que les exosomes contiennent des ARN et les caractériser. Toutes les mises au point ont été réalisées avec des exosomes de N2a, moins coûteux à obtenir que des exosomes de neurones en culture primaire. Avec Catherine Rey, ingénieur sur la plateforme ProfilXpert, nous avons dans un premier temps mis au point un protocole de purification des ARN totaux présents dans les exosomes de N2a. Le profil Agilent de ces ARN totaux a été dressé et comparé à celui des ARN totaux extraits des lysats cellulaires (Figure 49B-D). Le Bioanalyzer Agilent 2100 est un système d'électrophorèse miniaturisé qui permet la détection de tous les ARN présents dans l'échantillon déposé sur la puce. Sur le gel contenu dans la puce, les ARN vont migrer selon leur taille (nombre de nucléotides, nt) et le résultat est donné sous forme de graphe. Sur un profil Agilent, les petits ARN apparaissent en premier suivis des ARN plus longs (Figure 49A). Lorsque l'on analyse le profil obtenu pour les ARN totaux cellulaires, on remarque la présence d'un pic relativement large pour les ARN de petite taille (25-200 nt), puis le profil s'étire et les ARN ribosomiques 18S et 28S sont repérables grâce à deux grands pics caractéristiques (Figure 49B).

Dans un culot 100 000 g de surnageants de N2a non traités à la RNase, il est possible de détecter à la fois la présence de petits ARN (≤ 200 nt) mais également des ARN ribosomiques 18S et 28S (Figure 49C). Une fois le culot 100 000 g traité à la RNase, nous avons constaté la disparition de ces pics 18S et 28S dans le profil Agilent correspondant (Figure 49D). Ces contaminations d'ARN ribosomiques sont probablement dues à la présence de polysomes dans nos échantillons, qui culottent à 100 000 g avec les exosomes. La mise au point d'un traitement à la RNase de nos surnageants nous a permis d'éliminer cette contamination. Nous sommes donc en mesure d'affirmer que dans la Figure 49D, les ARN détectés par le Bioanalyzer Agilent dans le culot 100 000 g sont des ARN protégés de l'action de la RNase car contenus dans les exosomes.

La majorité des ARN détectés dans les exosomes de N2a ont une taille inférieure ou égale à 200 nt. Au-delà, le profil s'étire, démontrant la présence d'ARN plus longs (jusqu'à 1000 nt environ) mais en beaucoup plus faible quantité. Contrairement aux cellules qui contiennent à la fois des ARN courts et des ARN longs et notamment des ARN ribosomiques repérables grâce aux pics caractéristiques 18S et

28S, les exosomes de N2a contiennent majoritairement des ARN de petite taille parmi lesquels se trouvent très probablement des microARN.

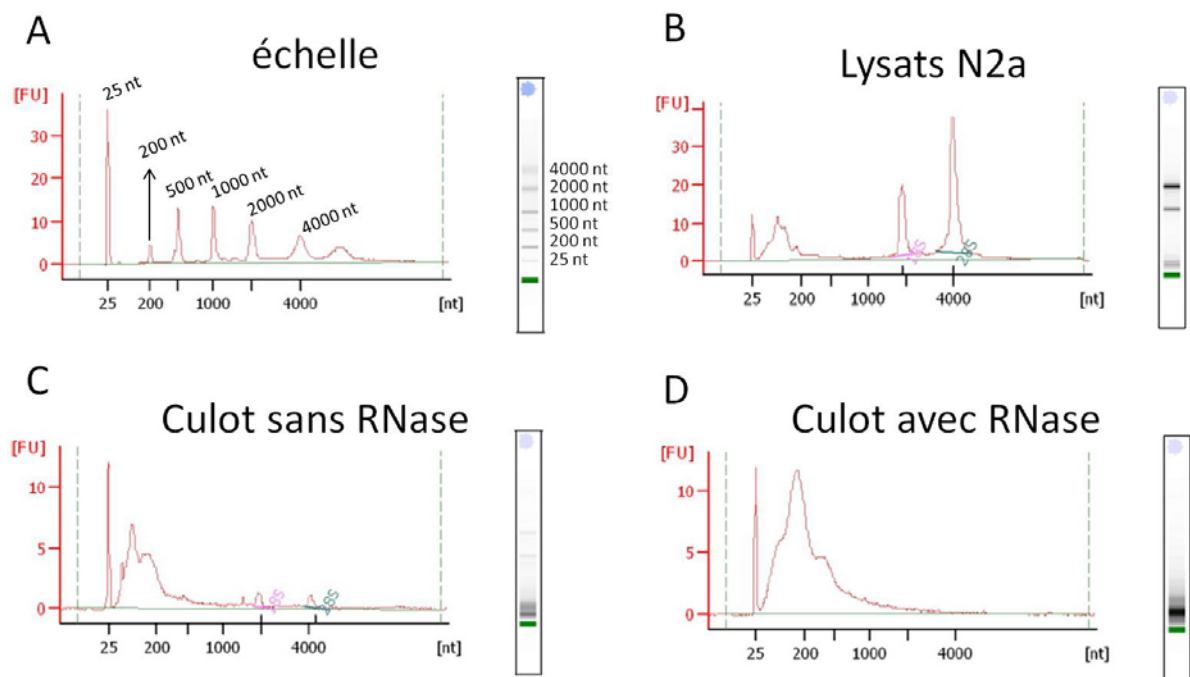


Figure 49 Les exosomes de N2a contiennent majoritairement des ARN de petite taille. Les ARN totaux contenus dans les cellules de N2a et leurs exosomes (culot 100 000 g) ont été isolés à l'aide des kits Qiagen *miRNeasy Mini Kit* et *RNeasy Micro Kit* (protocole C. Rey) et analysés sur picopuce Bioanalyser Agilent 2100. A) graphe obtenu avec un échantillon-échelle (*ladder*) permettant de relier la taille des ARN à leur profil de migration (marqueurs de taille) ; B) profil obtenu avec les lysats cellulaires de N2a, on y distingue, entre autres, les pics correspondants aux ARN ribosomiques 18S et 28S ; C) profil des ARN contenus dans un culot 100 000 g non traité à la RNase, les pics 18S et 28S y sont visibles ; D) le traitement à la RNase du culot 100 000 g supprime les ARN ribosomiques, les exosomes contiennent surtout des ARN de taille ≤ 200 nt.

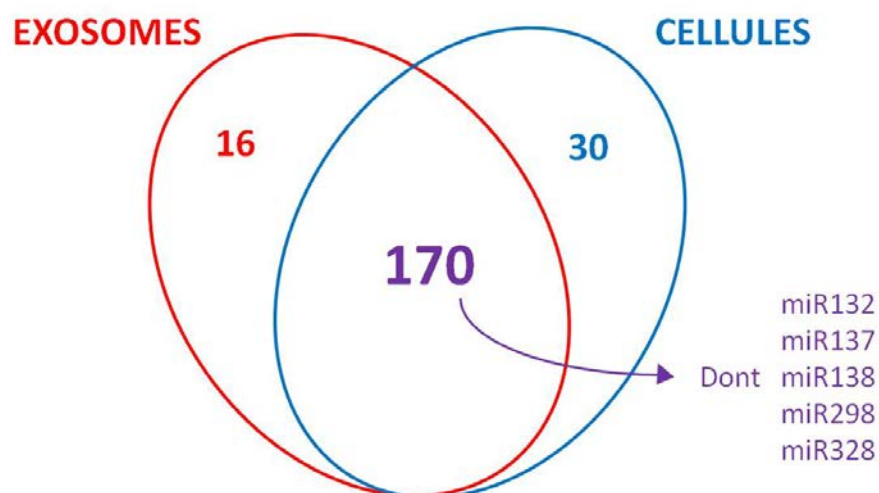


Figure 50 Profil des microARN présents dans les exosomes de N2a et dans leurs cellules sécrétrices. Analyse réalisée sur plaques TLDA (Applied Biosystems). 186 microARN ont été identifiés dans les exosomes dont 16 particulièrement enrichis par rapport aux cellules. Parmi les microARN détectés dans les exosomes, les miR132, 137, 138 et les miR298 et 328 sont impliqués dans la régulation génique du SNC physiologique et pathologique.

Nous avons testé plusieurs méthodes d'extraction et à chaque fois, le profil Agilent obtenu pour les exosomes de N2a comportait majoritairement des ARN courts (≤ 200 nt). Nous avons alors cherché à identifier les microARN présents dans les exosomes. Le système TLDA (TaqMan Low Density Array) d'Applied Biosystems est un appareil de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en temps réel haut débit réalisée sur des cartes microfluidiques (plaques TLDA), pré-chargées avec les amorces et sondes TaqMan spécifiques (life technologies). L'utilisation de ces plaques TLDA (avec les amorces des microARN de rongeur) a permis l'identification de 186 microARN dans les exosomes de N2a dont 170 en commun avec les cellules (Figure 50). Parmi les microARN (miR) identifiés dans les exosomes de N2a, se trouvent 5 miR qui ont retenu notre attention : miR138, miR132, miR328, miR298, miR137 car ils ont été directement impliqués dans des phénomènes de régulation génique dans les neurones. En effet, ils seraient impliqués dans le développement et le fonctionnement du cerveau et incriminés dans des maladies développementales, neurodégénératives et des troubles du comportement (Schratt, 2009).

2. Analyse du contenu en ARN des exosomes neuronaux

Nous avons vérifié que les exosomes neuronaux contenaient également des ARN (coll. Joël Lachuer, C. Rey) en dressant le profil Agilent d'un culot 100 000 g d'exosomes sécrétés par des neurones corticaux dont les surnageants avaient été préalablement traités à la RNase (Figure 51). D'autres microvésicules contenant de l'ARN protégé peuvent potentiellement être culottées à 100 000 g en même temps que les exosomes. Pour séparer les vésicules en présence, nous avons déposé le culot 100 000 g sur un gradient continu de sucrose. 10% de chaque fraction ont été analysés en Western blot afin de repérer les protéines Alix et Flotilline-1 et donc les exosomes qui les contiennent. Les ARN contenus dans les 90% restant ont été analysés grâce au Bioanalyzer Agilent 2100 (Figure 52). La Figure 52 montre les profils obtenus pour l'ensemble du gradient et le Western blot qui lui est associé. Le Western blot révèle la fraction 5 comme positive pour Alix et Flotilline-1, démontrant la présence d'exosomes dans cette fraction. Il est à noter que le dépôt de seulement $1/10^e$ des fractions sur le gel de Western blot ne permet de détecter que le pic d'exosomes, il est probable que des exosomes se trouvent également dans les fractions alentours, c'est-à-dire les fractions 4 et 6 mais en moindre quantité. Dans les profils Agilent, on peut voir que les premières fractions du gradient sont vides de tout ARN. Par contre, un pic d'ARN courts est bien visible dans les fractions 4 et 5 (Figure 52, encadré). Ensuite, le profil du signal décroît et disparaît dans les fractions suivantes, dénotant une absence d'ARN dans ces fractions. La torsion de la ligne de base observée en fond de gradient serait due à l'absence de matériel génétique et à la présence de résidus de phénol.

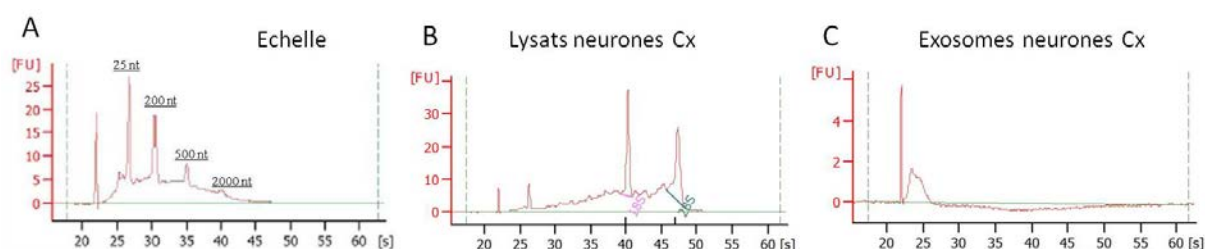


Figure 51 Les exosomes sécrétés par les neurones corticaux en culture contiennent majoritairement des microARN. Les ARN totaux contenus dans les neurones corticaux (Cx) et leurs exosomes (culot 100 000 g) ont été isolés à l'aide des kits Qiagen *miRNeasy Mini Kit* et *RNeasy Micro Kit* (protocole C. Rey) et analysés sur picopuce Bioanalyser Agilent 2100, les surnageants ont été préalablement traités à la RNase. A) graphe obtenu avec un échantillon-échelle permettant d'établir la correspondance entre la taille des ARN (nucléotides, nt) et la valeur en abscisse donnée en secondes (s) ; B) profil des ARN cellulaires, on dénote la présence des ARN ribosomiques 18 S et 28 S ; C) Les exosomes de neurones corticaux (Cx) contiennent des ARN de taille ≤ 25 nt, il s'agit très probablement de microARN.

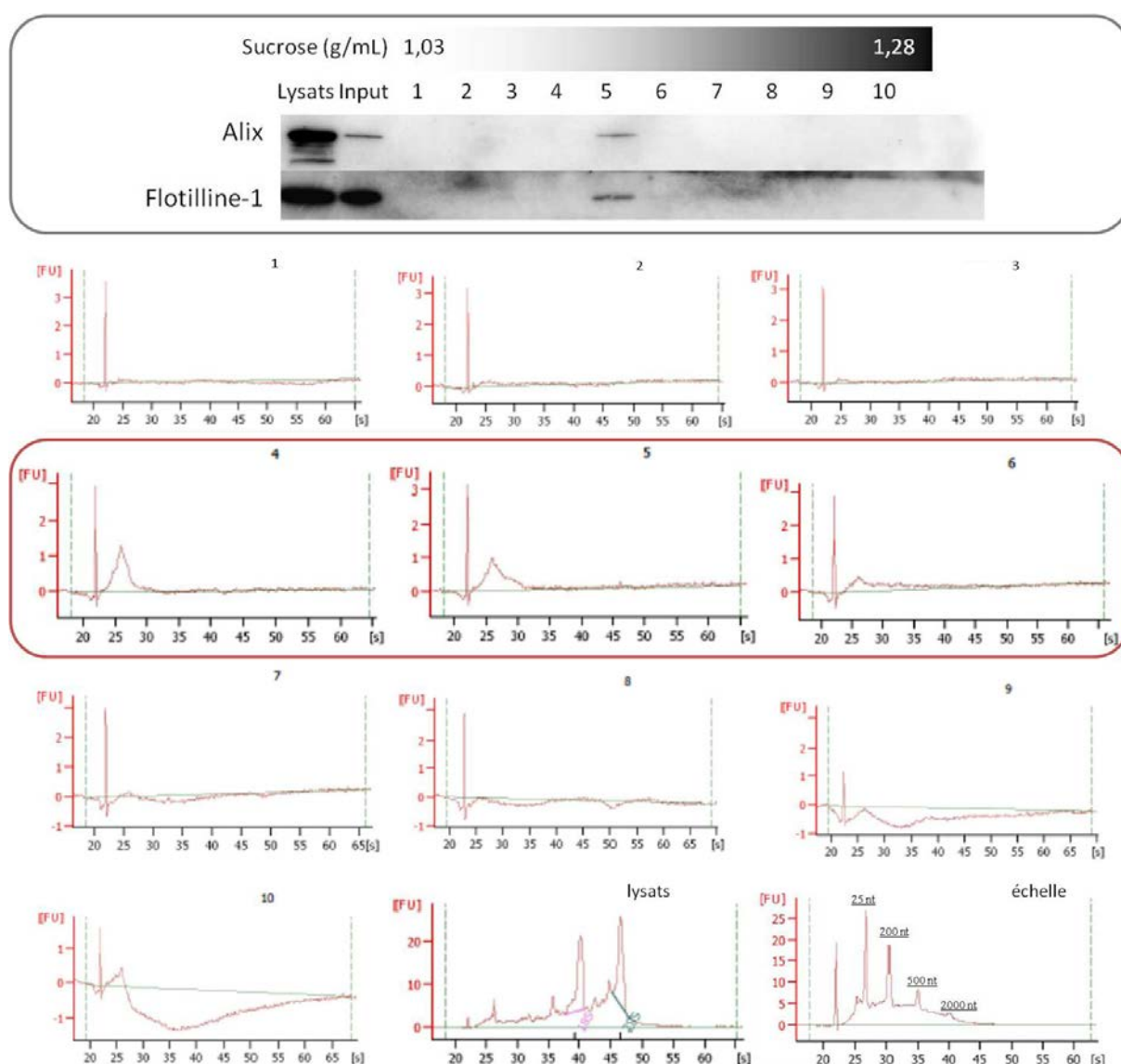


Figure 52 Les petits ARN repérés dans le culot 100 000 g sont bien contenus dans des exosomes. Les surnageants de neurones corticaux stimulés en K25 ont été récupérés, traités à la RNase et le culot 100 000 g a été déposé sur un gradient continu de sucrose. Les lysats, l'*input* (=5% du culot 100 000 g) et 1/10^e des fractions ont été analysés en Western blot. Les exosomes, repérés avec un anti-Alix et un anti-Flotilline-1 se concentrent dans la fraction 5. Les ARN cellulaires et les ARN contenus dans chaque fraction ont été isolés (Qiagen, protocole C. Rey) et leur profil Agilent, dressé (Picopuce). Les petits ARN sont sécrétés en association avec les exosomes (fractions centrales encadrées).

Dans cette expérience réalisée sur des neurones stimulés en K25, les petits ARN sont détectés dans les fractions du gradient où se trouvent les exosomes. Ils ont été protégés de l'action de la RNase par la membrane des exosomes qui les contenaient. Nous avons aussi réalisé cette observation sur des neurones stimulés à la bicuculline (**Figure 53**). Là encore, les petits ARN trouvés dans un culot 100 000 g sont contenus dans les exosomes sécrétés par les neurones et séparés sur gradient continu de sucrose. Ceci est particulièrement visible dans la **Figure 53A** où le signal observé pour la fraction 5 se confond totalement avec celui observé pour le culot 100 000 g (*input*: 5% du culot). *A contrario*, il domine nettement les profils des fractions 6 et 9 (**Figure 53B**).

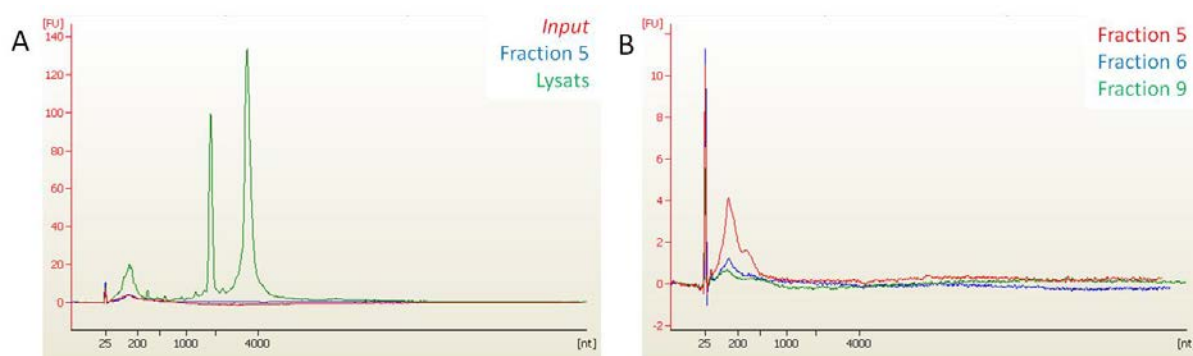


Figure 53 Profil Agilent des exosomes neuronaux stimulés à la bicuculline. Des neurones corticaux (15 DIV) ont été stimulés 15 minutes avec 40 μ M de bicuculline. Les surnageants ont été récoltés, traités à la RNase et le culot 100 000 g déposé sur un gradient continu de sucrose. Les ARN cellulaires, les ARN présents dans l'*input* (5% du culot 100 000 g) et les ARN contenus dans chaque fraction ont été isolés (Qiagen, protocole C. Rey) et leur profil Agilent, dressé (Picopuce). A) comparaison des profils obtenus pour les lysats cellulaires (en vert), la fraction 5 (exosomale, en bleu) et l'*input* (en rouge). Les courbes bleue et rouge se superposent parfaitement ; B) comparaison des profils de la fraction 5 (exosomes, en rouge), de la fraction 6 (en bleu) et de la fraction 9 (fond du gradient, en vert). Les ARN se concentrent dans la fraction exosomale.

D'après nos observations, les exosomes de neurones corticaux contiennent majoritairement des ARN courts dont probablement des microARN. En nous basant sur l'étude transcriptomique faite sur les exosomes de N2a (plaques TLDA cf. [Figure 50](#)), nous nous sommes concentrés sur deux microARN détectés dans ces exosomes : le miR132 et le miR138. Ces deux microARN jouent des rôles clés dans des aspects de développement et de plasticité neuronale et leur dysfonctionnement conduit à l'apparition de pathologies ([Im and Kenny, 2012](#)). Nous nous sommes demandé si ces deux miR étaient présents dans les exosomes de neurones corticaux. En collaboration avec Hélène Ipas, doctorante sur la plateforme transcriptomique de l'institut (Equipe Nanosciences et Cerveau), nous avons réalisé des RT-q-PCR sur des lysats et des exosomes de N2a en parallèle de lysats de neurones corticaux et de leurs exosomes ([Figure 54](#)). Après extraction des ARN courts (à l'aide du kit *miRNeasy mini*, en suivant l'appendix 'ARN courts'), les profils de nos différents échantillons ont été analysés sur puce Agilent. Dans nos quatre éluats, nous avons confirmé la présence d'ARN dont la taille est inférieure ou égale à 200 nt ([Figure 54A](#)).

Une fois nos échantillons validés, nous avons procédé à des réactions de transcription inverse ou RT (*Reverse Transcription*) avec des amorces spécifiques pour les microARN matures miR132 et miR138 respectivement. Enfin, les produits des RT ont subi une amplification en q-PCR (*quantitative PCR*). Alors que la PCR est une technique qualitative de détection de la présence, après amplification, de l'ADN complémentaire (ADNc) du miR d'intérêt, la q-PCR est utilisée pour mesurer quantitativement l'amplification de cet ADNc grâce à des sondes fluorescentes. Lors de la q-PCR, la formation de chaque nouvel amplicon est détectée par l'accumulation d'un signal fluorescent. Le Ct (*cycle threshold*) est défini comme le nombre de cycles d'amplification nécessaire pour atteindre une valeur-seuil du signal fluorescent (*threshold*) définie au-delà de tout bruit de fond ([Figure 54B](#)). Le nombre de Ct est corrélé négativement à la quantité de l'ADN cible présent dans l'échantillon. Ainsi, pour les lysats de N2a, le Ct pour le miR132 est bien plus élevé que le Ct du miR138. Cela signifie que ces lysats cellulaires sont très enrichis en miR138 par rapport au miR132. On constate le même profil d'enrichissement dans leurs exosomes. Quant aux lysats de neurones corticaux, ils sont relativement enrichis en miR138 par rapport au miR132. *A contrario*, leurs exosomes contiennent plus de miR132 que de miR138 ([Figure 54](#)). Cette différence d'enrichissement démontre la sélection des miR exosomaux.

En purifiant les vésicules culottées à 100 000 g sur un gradient continu de sucrose, nous avons démontré que les petits ARN détectés étaient strictement contenus dans les exosomes. Les exosomes neuronaux contiennent majoritairement des ARN courts, parmi lesquels les miR138 et 132, identifiés en RT-q-PCR.

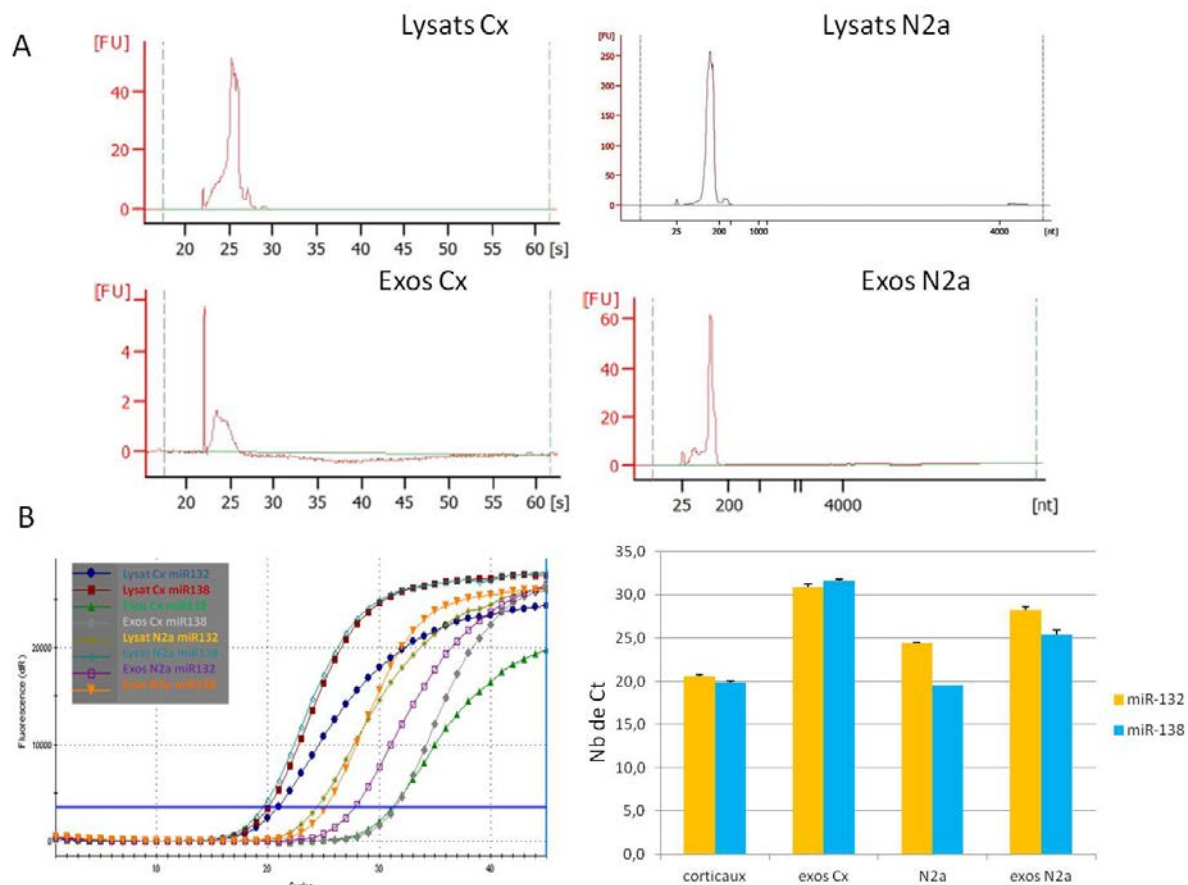


Figure 54 Les exosomes neuronaux contiennent les miR 132 et 138. Des neurones corticaux (15 DIV) ont été stimulés 15 minutes avec 40 μ M de bicuculline, les surnageants ont été récoltés, traités à la RNase et culottés à 100 000 g (Exos Cx). Des N2a ont été lavées 2 fois en PBS, placées dans du milieu « *exosome-free* » pendant 24h. Leurs surnageants ont été récoltés, traités à la RNase et culottés à 100 000 g (Exos N2a). Les ARN courts (≤ 200 nt) ont été isolés à partir des lysats de neurones corticaux (Lysats Cx), de N2a (Lysats N2a) et de leurs exosomes respectifs à l'aide du kit *miRNeasy mini*, appendix 'ARN courts' de Qiagen. A) vérification des profils Agilent des ARN isolés à partir des lysats cellulaires (neurones corticaux et N2a) et de leurs exosomes respectifs (culot 100 000 g) (Picopuce Bioanalyser Agilent 2100) ; B) les miR 132 et 138 sont sélectivement enrichis dans les exosomes neuronaux et de N2a. RT-q-PCR des quatre échantillons avec des amorces spécifiques pour le miR132 et pour le miR138 respectivement (Taqman, life technologies).

3. La surexpression de miR dans les N2a conduit à leur enrichissement dans les exosomes

Dans l'optique de mesurer l'impact des miR exosomaux sur les neurones en culture, nous avons dans un premier temps vérifié que la surexpression d'un microARN donné conduit à son enrichissement dans les exosomes sécrétés. Nous avons transfecté transitoirement des N2a avec un plasmide codant pour le pré-miR138 (<http://www.addgene.org/26328/>). Le pré-miR est un précurseur du miR, c'est un ARN long d'environ 70 nucléotides qui va être processé dans le cytosol pour donner un miR fonctionnel au sein du complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*). Nous avons ensuite mesuré en RT-q-PCR l'enrichissement du microARN mature miR138 en utilisant le miR132 endogène comme contrôle. Pour ce faire, nous avons réalisé l'extraction des ARN courts (≤ 200 nt) pour des N2a non transfectées, pour des N2a transfectées pour le pré-miR138 et leurs exosomes respectifs. Nous avons vérifié sur picopuce Agilent la présence et la qualité des ARN courts isolés puis procédé à la RT-q-PCR avec les amorces spécifiques pour le miR132 et le miR138 respectivement. Alors que le nombre de Ct pour le miR132 est quasiment inchangé entre les cellules transfectées miR138 et les non-transfectées, la transfection du pré-miR138 se traduit par un net enrichissement pour le miR138 mature. Chose remarquable, les exosomes des N2a transfectées sont également très enrichis pour ce miR (Figure 55). Les N2a sécrètent donc de manière active des microARN endogènes et exogènes par la voie des exosomes.

Nous avons validé la production d'exosomes enrichis en miR138. Il serait intéressant de les incubé sur des neurones receveurs pour en mesurer l'effet physiologique. Ces travaux vont maintenant être repris par Charlotte Javalet en doctorat dans le laboratoire depuis le 1^{er} Octobre dernier, sur la thématique des exosomes neuronaux.

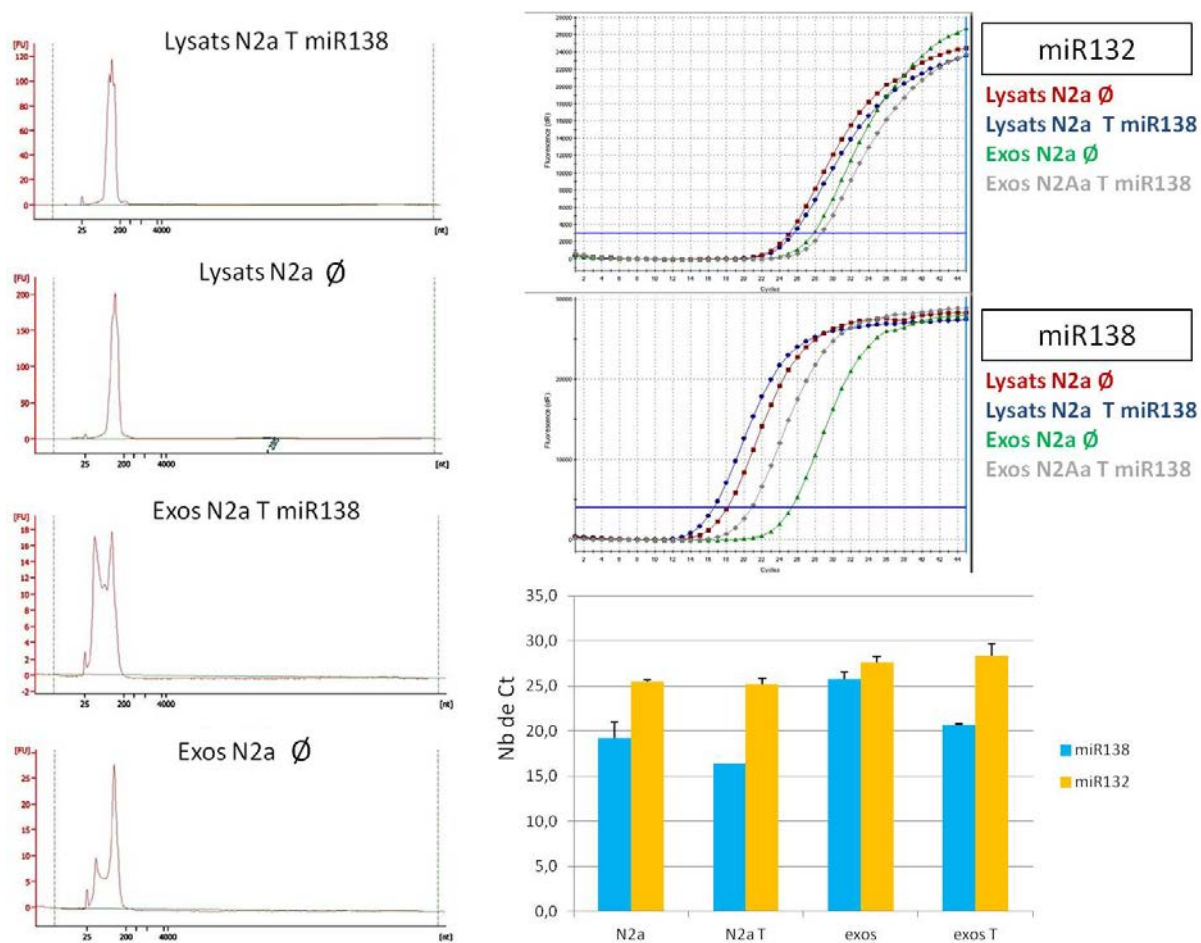


Figure 55 La transfection du miR138 dans les N2a conduit à son enrichissement dans les exosomes qu'elles sécrètent. Des N2a ont été transfectées transitoirement avec un plasmide codant pour le pré-miR138. 24h après la transfection, leur milieu a été remplacé par du milieu « exosome-free ». Au bout de 24h, les surnageants ont été récupérés, traités à la RNase et les exosomes culottés à 100 000 g. Des N2a non transfectées et leurs exosomes sont traités en parallèle (Ø). Les ARN courts (≤ 200 nt) ont été isolés à partir des lysats de cellules transfectées (Lysats N2a T miR138), de N2a non transfectées (Lysats N2a Ø) et de leurs exosomes respectifs à l'aide du kit « miRNeasy mini » de Qiagen. A gauche, sont représentés les profils Agilent des quatre échantillons : les lysats cellulaires, transfectés ou non et leurs exosomes respectifs (Picopuce Bioanalyser Agilent 2100). A droite, visualisation des Ct (*cycle threshold*) obtenus pour les RT-q-PCR réalisées avec les amorces spécifiques pour le miR132 (contrôle) et pour le miR138 respectivement (Taqman, life technologies). Le miR138 est clairement enrichi dans les exosomes de N2a transfectées.

Discussion

Cela fait bientôt trente ans qu'il a été découvert que les endosomes multivésiculés pouvaient fusionner avec la membrane plasmique libérant ainsi leurs vésicules intraluminales, qui une fois dans le milieu extracellulaire, prennent le nom d'exosomes. Les exosomes ont dans un premier temps été considérés comme des sortes de « bennes à ordures » pour les cellules qui les sécrétaient. Ils représentaient un moyen pour ces cellules de se débarrasser de protéines dont elles n'avaient plus besoin. Il a été démontré, *in vivo* et *in vitro*, que la libération d'exosomes par les globules rouges était un moyen, durant la différenciation des réticulocytes en érythrocytes, de se débarrasser de protéines de la membrane plasmique, diminuant ainsi en taille et perdant certaines activités spécifiques membranaires (Johnstone, 2006; Vidal et al., 1997).

D'abord confidentiel, le nombre d'études portant sur les exosomes sécrétés par des types cellulaires variés a considérablement augmenté ces dernières années. Toutes aspirent à mieux comprendre les rôles physiologiques et pathologiques de ces drôles de vésicules. En effet, de par leur contenu en protéines, lipides et en ARN, les exosomes ne peuvent être réduits à des « bennes à ordures » cellulaires et joueraient un rôle important dans les communications intercellulaires.

Notre laboratoire s'intéresse aux exosomes neuronaux et a d'ores et déjà apporté la démonstration que des neurones à 8 jours de culture *in vitro* (8 DIV) sont capables d'en sécréter et que la dépolarisation membranaire, par ajout de potassium dans le milieu extracellulaire, conduit à une augmentation de leur libération (Faure et al., 2006).

I. Les neurones sécrètent des exosomes de façon régulée

Au cours de ma thèse, nous nous sommes intéressés à la sécrétion d'exosomes par des neurones matures. Agés de 15 et 21 DIV, les neurones corticaux et hippocampiques sécrètent des exosomes dans leur milieu de culture. Sans stimulation préalable, cette sécrétion est difficilement observable. Nos travaux nous ont permis de mettre au point trois protocoles permettant d'induire la sortie des exosomes de neurones : la dépolarisation membranaire, l'ajout d'un ionophore de calcium (la ionomycine), l'incubation avec de la bicuculline (un inhibiteur des récepteurs GABA_A, qui de ce fait, augmente l'activité des synapses glutamatergiques).

1. Régulation par le calcium

Dans le laboratoire, nous avons observé que l'incubation des neurones dans une solution contenant 25 mM de KCl (appelée K25) stimulait la sortie des exosomes. L'élévation de la concentration

extracellulaire en potassium conduit à une dépolarisation de la membrane plasmique. Cela favorise le déclenchement de potentiels d'action et donc d'une part augmente la concentration en calcium intracellulaire et d'autre part facilite l'activité spontanée des neurones en présence.

Que ce soit sur neurones jeunes ou matures, nous avons utilisé un temps d'incubation relativement longs : 2 à 3h dans du milieu K25. Ce temps long de dépolarisation n'est pas forcément compatible avec la démonstration de l'implication directe du calcium intracellulaire dans des phénomènes de fusion des endosomes multivésiculés (MVE) avec la membrane plasmique (MP). Même si nos observations sont compatibles avec d'autres (Savina et al., 2003), elles ne nous permettent pas de relier strictement l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire à une augmentation des événements de fusion MVE-MP, l'augmentation de la quantité d'exosomes sécrétés pouvant provenir indirectement d'une augmentation de l'endocytose due à l'activité neuronale accrue (Ehlers, 2000).

A 8 jours de culture, les neurones sont encore en développement et ont établi peu de connections synaptiques. Néanmoins, à ce stade, des neurones d'hippocampe en culture sécrètent du glutamate de manière calcium-dépendante et cela, avant même qu'il y ait formation de synapses (Verderio et al., 1995). L'effet de la dépolarisation sur la sécrétion des exosomes de neurones jeunes fait probablement intervenir majoritairement des canaux calciques voltage-dépendants extra-synaptiques.

En revanche, à 15 jours de culture, les neurones constituent un réseau dense ayant formé de nombreuses connections synaptiques. Comme chez les neurones jeunes, nous avons constaté que l'incubation des neurones matures dans un milieu dépolarisant pendant 3h provoquait une augmentation de la sortie des exosomes par rapport à un milieu basal. Dans un neurone exciteur, la dépolarisation va entraîner la formation d'un potentiel d'action qui, arrivé au niveau de l'extrémité pré-synaptique, provoque l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants, favorisant la sécrétion de glutamate. Ce dernier, une fois dans la fente synaptique va se fixer aux récepteurs AMPA dont l'ouverture va provoquer une dépolarisation de la membrane post-synaptique, permettant l'ouverture des récepteurs NMDA qui laissent alors entrer le Ca^{2+} en post-synaptique (Sudhof, 2012). La dépolarisation de neurones matures provoque l'ouverture de canaux calciques synaptiques et extra-synaptiques. Elle induit une entrée de calcium à la fois dans les éléments pré- et post-synaptiques.

L'utilisation de ionomycine sur des temps courts nous a permis de consolider nos observations en K25. En effet, l'entrée de Ca^{2+} après incubation avec de la ionomycine augmente la sécrétion exosomale en 5 minutes seulement. Cette augmentation peut être annulée si l'on pré-incube les

neurones avec du BAPTA-AM, qui chélate le Ca^{2+} intracellulaire. Le temps court de récolte des exosomes nous assure ici que l'augmentation de sécrétion exosomale est bien le résultat d'un accroissement de la fréquence de fusion des MVE avec la MP, et non d'une augmentation de l'endocytose. Il nous est désormais possible d'affirmer que la fusion des MVE avec la MP des neurones en culture est régulée par le calcium intracellulaire.

i. Quels sont les canaux calciques impliqués dans la libération des exosomes ?

La ionomycine induit une entrée de Ca^{2+} à la fois dans les éléments pré- et post-synaptiques comme la dépolarisation massive de neurones matures. Dans les neurones à 8DIV, il est difficile de distinguer des éléments pré et post-synaptiques. Dans ces neurones en développement, ce sont surtout les canaux calciques voltage-dépendants de type N qui permettent l'entrée de calcium (puis la sortie de neurotransmetteurs) (Verderio et al., 1995). Ce type de canaux peut être inhibé par la ω -conotoxine-GVIA, une neurotoxine isolée à partir du venin d'un mollusque du genre *Conus* (Adams et al., 2012).

Il est connu que les neurones expriment à leur membrane différents canaux calciques voltage-dépendants (CCVD) (Bertolino and Llinas, 1992). Par une approche pharmacologique, il est possible de différencier ces canaux en isolant les différents courants de calcium créés (Lorenzon and Foehring, 1995a; Lorenzon and Foehring, 1995b; Pieri et al., 2012). En effet, la ω -conotoxine-GVIA permet de bloquer les CCVD de type N et la ω -agatotoxine-IVA, isolée à partir de venin d'araignées, bloque les CCVD de type Q/P. Quant aux nifedipine et nimodipine, elles bloquent les CCVD de type L. Grâce à ces différents agents pharmacologiques, nous pourrions identifier les CCVD susceptibles d'être impliqués dans la régulation de la sortie des exosomes.

Les neurones possèdent également des récepteurs-canaux ionotropiques purinergiques, les P2X. Ces derniers, après fixation de leur ligand, l'ATP (Adénosine triphosphate), s'ouvrent et permettent le passage de cations, participant ainsi à la dépolarisation membranaire. Il existe sept sous-types de récepteurs P2X (P2X1-7), associés sous forme de trimères, plus ou moins exprimés par les cellules de l'organisme. Le P2X2 est le sous-type le plus largement distribué dans l'organisme, il est notamment présent dans le SNC (Tozaki-Saitoh et al., 2011). Le mécanisme physiologique majeur auquel participent les récepteurs P2X activés est le contrôle des fonctions cellulaires par l'élévation de la concentration de calcium intracellulaire. Cela, tant par l'entrée directe de Ca^{2+} par leur pore qu'indirectement en facilitant l'ouverture des CCVD. Les P2X modulent la sécrétion des neurotransmetteurs et participeraient à la plasticité synaptique (Pankratov et al., 2009).

L'implication d'un récepteur de cette famille, le P2X7R, dans la régulation de la sécrétion d'exosomes par des macrophages (Qu and Dubyak, 2009) laisse penser que les récepteurs-canaux P2X pourraient

participer à l'augmentation de calcium cytosolique permettant d'accroître directement la fusion des MVE neuronaux avec la MP. L'existence de plusieurs souris KO pour différents sous-types constitue un outil de choix pour étudier leur implication dans la sécrétion exosomale (Tozaki-Saitoh et al., 2011).

ii. Quelle est la machinerie moléculaire mise en jeu lors de la fusion du MVE avec la membrane plasmique ?

Dans les neurones, le Ca^{2+} intracellulaire intervient dans le fonctionnement de la machinerie de fusion des MVE avec la MP et nous pouvons émettre l'hypothèse que cette fusion fait probablement intervenir le complexe SNARE. Dans la famille des P2X, le récepteur P2X2 interagit avec une protéine senseur du calcium, la VILIP1 (*visinin-like protein 1*) qui modulerait la fonction de ce récepteur-canal (Chaumont et al., 2008). Au niveau de la membrane pré-synaptique, la synaptotagmine, une protéine senseur du calcium, est connue pour interagir avec le complexe SNARE et participer à l'exocytose des vésicules synaptiques (Davis et al., 1999). Dans le système nerveux, les synaptotagmines I, II et IX constituent les senseurs de calcium prédominants dont la délétion aboutit à une perte complète de l'exocytose rapide, calcium-dépendante des neurotransmetteurs (Jahn and Fasshauer, 2012). En présence de calcium, la synaptotagmine interagit avec les phospholipides membranaires et avec la syntaxine (une t-SNARE de la membrane plasmique). La sensibilité de la libération de neurotransmetteurs au calcium est directement liée à l'affinité de la synaptotagmine pour cet ion (Fernandez-Chacon et al., 2001). Il a également été démontré que la synaptotagmine interagit avec différents canaux calciques voltage-dépendants : les CCVD de type P/Q (Charvin et al., 1997), de type L (Wiser et al., 1999) et de type N (Leveque et al., 1992). L'augmentation de calcium intracellulaire stimule l'interaction de la synaptotagmine avec le complexe SNARE, les phospholipides et également avec les canaux Ca^{2+} dépendants du potentiel, et diminue son affinité pour SV2, une protéine des vésicules synaptiques. La formation d'un large complexe regroupant l'ensemble des acteurs de la fusion membranaire autour du site d'entrée du calcium dans la cellule représente un modèle intéressant pour la fusion des MVE avec la MP.

La synaptotagmine VII est retrouvée au niveau des granules sécrétoires des cellules pancréatiques et associée aux lysosomes de plusieurs types cellulaires comme les macrophages et les cellules dendritiques (Gao et al., 2000; Martinez et al., 2000). La synaptotagmine VII est le senseur calcique qui régule l'exocytose des lysosomes, un procédé par lequel les cellules eucaryotes réparent leur membrane plasmique. Dans les neurones, la synaptotagmine VII régule l'exocytose des lysosomes mise en jeu dans la poussée neuritique (Arantes and Andrews, 2006). Cependant, il manque dans la séquence de cette protéine les motifs lui permettant d'être adressée aux lysosomes, sa présence au niveau de ces organelles était donc peu comprise. Il a été démontré en 2010, que les tétraspanines

CD63 présentes à la membrane lysosomale sont responsables du recrutement de la synaptotagmine VII palmitoylée, au niveau du lysosome. Une fois recrutée, elle peut alors y jouer son rôle de régulateur calcique de l'exocytose (Flannery et al., 2010). La fusion d'un MVE avec la MP met sans doute en jeu un ou des senseurs calciques tels que la synaptotagmine. On est en droit d'imaginer que les tétraspanines qui sont enrichies dans les MVE (Thery et al., 2009; Wubbolts et al., 2003) participent au recrutement d'un senseur calcique pour l'exocytose des exosomes.

Plusieurs GTPases Rab ont été impliquées dans le déplacement et l'amarrage du MVE à la MP : Rab11 (Savina et al., 2005; Savina et al., 2002), Rab27a et b (Bobrie et al., 2012; Ostrowski et al., 2010), Rab35 (Hsu et al., 2010). De même que les SNARE et les protéines qui leur sont associées comme la synaptotagmine varient en fonction du type cellulaire et du type de fusion (l'exocytose des vésicules synaptiques dans les neurones versus la sécrétion d'insuline par des cellules β -pancréatiques par exemple), l'implication de telle ou telle Rab semble dépendre du type cellulaire. Néanmoins, ces différentes études sont un point de départ essentiel pour mieux comprendre la machinerie protéique intervenant dans la libération des exosomes. Du côté des SNARE, la v-SNARE Vamp7, qui est impliquée dans la fusion lysosome-MP et la fusion lysosome-endosome, serait impliquée dans la fusion des MVE dans des cellules K562 (Fader et al., 2009). Récemment, une étude portant sur la sécrétion de la protéine Wnt dans les exosomes a impliqué une autre protéine SNARE. La voie de signalisation Wnt est essentielle dans l'embryogenèse et l'homéostasie des tissus adultes. Les Wnt sont des morphogènes dont le transport à travers les tissus reste obscur. Il a été montré dans la drosophile que le signal Wnt/Wingless (Wg) pouvait être transmis via la sécrétion d'exosomes contenant la protéine transmembranaire Evi (*Evenness Interrupted* qui se fixe à Wg) des boutons présynaptiques à la jonction neuromusculaire larvaire (Koles et al., 2012; Korkut et al., 2009). Récemment, une équipe a démontré que des protéines Wnt actives étaient sécrétées par la voie des exosomes chez la drosophile et dans des cellules humaines. Dans cette étude a été identifiée par criblage ARNi, une v-SNARE, Ykt6 comme intervenant dans la sécrétion des exosomes Wnt. Les auteurs ont démontré que cette SNARE Ykt6 est essentielle pour la sécrétion des exosomes Wnt en culture et *in vivo* (Gross et al., 2012). Cette technique de criblage sur banque d'ARNi devrait se généraliser à tous les types cellulaires et notamment aux neurones afin de mieux comprendre les mécanismes de libération des exosomes.

2. Régulation par l'activité synaptique

Au cours de ma thèse, nous avons démontré que l'activité glutamatergique augmente significativement la sécrétion exosomale (article 1). La bicuculline en se fixant aux récepteurs GABA_A va lever l'inhibition induite par ces récepteurs et de ce fait, augmenter l'activité glutamatergique de

la culture. L'ajout d'un antagoniste aux récepteurs NMDA, le MK801 (Dizocilpine), réduit la sécrétion d'exosomes neuronaux induite par la bicuculline. Or, les récepteurs NMDA sont des récepteurs ionotropes perméables au Ca^{2+} qui doivent, pour s'ouvrir, être stimulés par l'arrivée du glutamate pré-synaptique, mais aussi par une dépolarisation post-synaptique causée par l'activation des récepteurs AMPA sensibles au glutamate et plus rapides que les NMDAR. La liaison du glutamate force un changement conformationnel du récepteur qui ouvre le pore, mais celui-ci ne peut se libérer de l'ion magnésium qui le bloque que s'il y a une dépolarisation qui le repousse. L'effet du MK801 sur la libération d'exosomes neuronaux suggère que l'accroissement de cette dernière observée avec la bicuculline passe par l'ouverture des NMDAR. De même, l'inhibition des AMPAR avec du CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione) en présence de bicuculline diminue la sécrétion d'exosomes neuronaux. En inhibant les récepteurs AMPA, on empêche la dépolarisation post-synaptique nécessaire à l'ouverture des récepteurs NMDA. Nous pouvons donc supposer que le Ca^{2+} qui entre par les récepteurs-canaux NMDA stimule la fusion des MVE avec la membrane plasmique. D'autant plus que la picrotoxine (qui bloque les récepteurs GABA_A) augmente également la sortie d'exosomes, ce qui démontre bien que cette sécrétion est régulée par l'activité synaptique glutamatergique. Enfin, l'utilisation de la tétrodontoxine empêche toute activité synaptique et bloque complètement la sortie des exosomes.

Au niveau des compartiments post-synaptiques des neurones matures, il semblerait que l'augmentation du calcium intracellulaire qui passe par les NMDAR augmente la fusion des MVE avec la membrane plasmique. Les neurones expriment différents types de canaux calciques dispersés à leur surface et présentent des récepteurs NMDA extra-synaptiques. Lorsque l'on stimule les neurones avec la bicuculline, seuls les NMDAR synaptiques sont impliqués dans l'entrée de calcium qui favorise la libération des exosomes neuronaux. On est en droit de se demander s'il s'agit du mécanisme physiologique majeur régulant la sortie des exosomes : est-ce que chez les neurones matures, la sécrétion d'exosomes ne dépend que des synapses ? Il existe des protocoles permettant d'activer de manière isolée les NMDAR extra-synaptiques. Réaliser de telles expériences nous permettrait de mieux caractériser l'implication de ces récepteurs dans la stimulation de la sortie des exosomes neuronaux (Bordji et al., 2010). C'est notamment ce sur quoi travaille actuellement Karine Laulagnier en contrat post-doctoral dans le laboratoire. Ses premiers résultats semblent montrer que l'activation des récepteurs NMDA extra-synaptiques ne stimule pas la sortie des exosomes.

i. Tous les MVE neuronaux libèrent-ils leurs vésicules intraluminales ?

Dans les neurones, les MVE ou MVB (*multivesicular bodies*) se trouvent majoritairement dans le soma et les dendrites, beaucoup moins dans les axones. D'après Altick et al, les MVE sont en effet 50

fois moins abondants dans les axones et les terminaisons axonales que dans les corps cellulaires et dendrites (Altick et al., 2009). Au niveau des dendrites, les MVE sont surtout localisés à la base des épines, compartiments post-synaptiques par excellence (Cooney et al., 2002; Parton et al., 1992). Or, les dendrites sont dépourvues de compartiments de dégradation, les lysosomes se concentrant au niveau du soma. On peut supposer que les MVE localisés dans les dendrites ont des fonctions différentes de ceux situés dans le corps cellulaire, à proximité des lysosomes (Parton et al., 1992). On peut imaginer que les MVE présents dans le soma soient majoritairement destinés à fusionner avec les lysosomes et leur contenu dégradé. Alors que la présence de MVE sous les épines dendritiques soulève la possibilité d'un rôle dans le recyclage, le stockage et l'approvisionnement de lipides et de protéines, comme des récepteurs transmembranaires (pour différents ligands, neurotransmetteurs...) soit par *back-fusion* et réexpression en surface au niveau post-synaptique, soit par sécrétion exosomale. Ainsi, les facteurs neurotrophiques BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) et GDNF (*Glial cell-Derived Neurotrophic Factor*) se concentrent dans les vésicules intraluminales des MVE situés dans le soma alors que dans les MVE dendritiques, ils sont retrouvés au niveau de leur membrane limitante (Rind et al., 2005). Cette constatation sous-entend un tri des cargos différent selon la localisation cellulaire. L'hypothèse de l'existence de plusieurs sous-types de MVE dans les neurones trouve un écho particulier dans la littérature actuelle où la cohabitation de plusieurs types de MVE de part leur biogénèse et leur fonction fait toujours débat (Stuffers et al., 2009; Von Bartheld and Altick, 2011; White et al., 2006).

Comme cela semble être le cas pour les réticulocytes (Johnstone, 2006; Vidal et al., 1997), la sécrétion des exosomes par les neurones pourrait représenter pour ces cellules extrêmement polarisées un moyen de pallier au manque de lysosomes à proximité des épines dendritiques. La ségrégation de ces compartiments de dégradation au niveau du corps cellulaire implique un trafic des endosomes qui doivent remonter jusqu'au soma pour permettre la dégradation du matériel endocyté. Compte-tenu de l'ampleur du trafic endocytaire nécessaire dans chaque épine, et du nombre d'épines susceptibles d'être monopolisées en même temps dans un neurone, il est facilement concevable que les neurones puissent avoir recours à un moyen plus simple d'évacuation du matériel superflu, en le sécrétant dans le milieu extracellulaire localement par voie exosomale.

ii. Modulation de la transmission synaptique ?

Par le fait qu'ils portent des récepteurs au glutamate, les exosomes neuronaux pourraient intervenir dans la physiologie des synapses. Les études réalisées sur les cellules dendritiques montrent que les protéines apportées par les exosomes peuvent être ré-exprimées en surface par de nouvelles cellules dendritiques qui endocytent les exosomes, les traitent selon un mécanisme encore mal défini avant de diriger certaines protéines à la membrane plasmique et les microARN dans le cytosol où ils exerceront leur activité régulatrice (Montecalvo et al., 2012; Morelli et al., 2004). L'expression de surface des récepteurs aux neurotransmetteurs, en particulier les récepteurs AMPA au glutamate, contrôle directement l'intensité de la dépolarisation, et donc l'activation, du neurone post-synaptique. Les exosomes neuronaux pourraient participer à la modulation de l'expression des récepteurs de surface en échangeant des protéines entre neurones, ou entre les synapses voisines d'un même neurone, contribuant ainsi à une communication inter-neuronale ou inter-synaptique encore jamais décrite.

De surcroît, l'implication du Ca^{2+} et des récepteurs NMDA synaptiques dans la régulation de la sécrétion des exosomes neuronaux suggère l'existence d'une communication inter-synaptique par voie exosomale qui serait modulée par l'activité synaptique elle-même. Une activation des récepteurs NMDA conduit à l'endocytose des récepteurs AMPA et à leur rapide réinsertion en surface (Beattie et al., 2000; Ehlers, 2000). On peut imaginer qu'il existe un passage exosomal depuis une synapse potentialisée vers les synapses alentours pour communiquer son état d'activation.

Enfin, il a été montré que le contenu en lipides de l'épine dendritique influence l'intensité de la transmission synaptique, en gérant l'expression de surface des récepteurs NMDA et AMPA par leur insertion dans des radeaux lipidiques (Abulrob et al., 2005; Francesconi et al., 2009). Les exosomes étant très riches en cholestérol et sphingolipides, la réinsertion, ou la fusion en surface, des zones de membranes apportées par les exosomes, est donc susceptible de modifier considérablement la transmission synaptique de la synapse cible. De plus, la présence de cholestérol à la surface des neurones contribue au maintien des épines dendritiques (Hering et al., 2003). Les exosomes pourraient permettre un apport de lipides aux épines, nécessaires à leur motilité, et sous le contrôle de l'activité des synapses adjacentes.

Les exosomes neuronaux apparaissent comme un moyen d'échange intercellulaire de grand potentiel dans le système nerveux. Cette perspective implique que les neurones soient capables de les réceptionner et d'utiliser les informations qu'ils véhiculent.

II. Recapture des exosomes par les neurones

1. Exosomes de N2a GFP-CD63

i. Suivi d'exosomes fluorescents

L'emploi de cellules de N2a pour obtenir des exosomes fluorescents s'est imposé pour plusieurs raisons. La culture de lignée est plus aisée que la culture primaire, les taux de transfection y sont plus élevés, la sélection clonale y est possible. Nous avons dans un premier temps vérifié que les N2a sécrétaient des exosomes dans nos conditions de culture et avons caractérisé ces exosomes. Par leur taille et leur morphologie, leur densité et les protéines qu'elles contiennent, nous avons été en mesure d'affirmer que les vésicules sécrétées par les N2a dans leur milieu extracellulaire sont des exosomes (Vlassov et al., 2012). Nous avons cependant remarqué que lorsque les exosomes sont séparés sur un gradient continu du sucrose, les pics Alix et Flotilline-1 sont décalés. Ce que nous n'avons pas constaté avec les exosomes neuronaux où les signaux Alix et Flot-1 cohabitent exactement dans les mêmes fractions. Il est possible que les N2a sécrètent plusieurs types de vésicules extracellulaires, certaines plus enrichies en Flotilline-1, d'autres en Alix. Ainsi Baïetti *et al* ont observé un comportement différent des exosomes selon les protéines qu'ils contiennent. Ils distinguent les exosomes Flotilline-1 positifs de ceux contenant le trio de protéines suivant : la tétraspanine CD63 et les protéines cytosoliques Alix et synténine (Baïetti et al., 2012). On est en droit de penser que les N2a sécrètent différentes sous-populations d'exosomes, certains étant particulièrement enrichis en radeaux lipidiques et donc en Flotilline-1 et ne flottant pas exactement à la même densité de sucrose que les autres. Le domaine de recherche sur les exosomes et les autres vésicules extracellulaires est en pleine extension et les caractéristiques qu'on leur attribue ne sont pas totalement figées et peuvent varier en fonction des découvertes. Mes travaux de thèse se focalisent sur les exosomes, c'est-à-dire les vésicules issues de la fusion d'un MVE avec la membrane plasmique mais nous ne pouvons pas ignorer la coexistence d'autres vésicules extracellulaires. D'ailleurs, dans le laboratoire, Christine Chatellard Causse s'intéresse, dans les N2a, aux microvésicules membranaires contenant la protéine ARRD1 (*arrestin domain-containing protein 1*) (Nabhan et al., 2012; Rauch and Martin-Serrano, 2010) et à la meilleure méthode pour les séparer des exosomes (cf. [Tableau 1](#) Introduction).

Nous avons testé par transfection transitoire, trois marqueurs fluorescents potentiels des exosomes : GFP-Alix, Flotilline-1-GFP et GFP-CD63. Les trois protéines sont considérées comme des marqueurs exosomaux car très souvent retrouvées dans les exosomes sécrétés par différents types cellulaires (Vlassov et al., 2012). La Flotilline-1-GFP ne s'exprimait pas bien dans les cellules et n'était pas détectable dans les exosomes des cellules transfectées. Nous avons concentré nos efforts sur les

deux autres constructions. La protéine de fusion GFP-Alix est certes présente dans les exosomes mais pas autant que l'endogène et surtout pas autant que GFP-CD63. Pourtant les deux protéines endogènes sortent toutes les deux dans les exosomes de N2a ([Figure 31](#)), Alix avant tout en tant que protéine cytosolique qui en participant à la formation des vésicules intraluminales (ILV) des MVE se retrouverait piégée dans les ILV formées alors que la tétraspanine CD63 est clairement enrichie dans les ILV par rapport à la membrane limitante du MVE et la membrane plasmique ([Escola et al., 1998](#); [Wubbolts et al., 2003](#)). Nous avons constaté que la protéine de fusion GFP-CD63 est très enrichie dans les exosomes de N2a et l'avons utilisée comme marqueur fluorescent. Nous avons mis au point une lignée exprimant constitutivement GFP-CD63 par sélection clonale. L'obtention de cette lignée nous a permis de nous passer de l'étape de transfection transitoire et de pouvoir disposer en permanence d'exosomes fluorescents tout en évitant les écueils de la surexpression.

Nous aurions également souhaité travailler avec des exosomes neuronaux rendus fluorescents. Nous avons pour cela effectué plusieurs essais avec un colorant lipidique fluorescent : le PKH67 (Sigma). De nombreuses études portant sur les exosomes ont en effet recours à ce colorant pour suivre leurs exosomes en microscopie à fluorescence (([Chiba et al., 2012](#); [Pegtel et al., 2010](#)) pour ne citer que ces deux là). En constatant que la coloration de PBS seul (en parallèle d'exosomes repris dans du PBS) suivie de l'incubation de ce PBS « coloré » donne à observer des points verts très similaires à ceux observés avec les exosomes marqués, je suis très sceptique quant à l'utilisation de ce colorant. Son protocole d'utilisation incluant des phases d'incubation avec du milieu et/ou du sérum, une contamination est vite arrivée et il n'est vraiment pas certain que seuls les exosomes soient colorés. Nous avons également effectué des essais de transfection dans les neurones avec nos plasmides décrits plus haut. Hélas, le taux de transfection faible chez les neurones matures n'est pas compatible avec l'observation des exosomes qu'ils sécrètent. La transduction virale ou la mise en culture de neurones de souris transgénique sont des outils à envisager sérieusement si l'on veut obtenir des exosomes fluorescents neuronaux en grande quantité.

En incubant des exosomes de N2a GFP-CD63 sur des neurones d'hippocampe en culture, nous avons observé en microscopie confocale à fluorescence que les exosomes se fixaient et étaient, la plupart du temps, internalisés par les neurones. Toutefois, il ne nous a pas été possible d'observer une internalisation des exosomes à chaque expérience réalisée. Alors que les exosomes GFP-CD63 se fixent systématiquement sur les cellules en culture, ils ne sont pas toujours endocytés. Sur l'ensemble des expériences conduites, les exosomes n'ont pas été internalisés dans un tiers des cas. Dans le laboratoire, nous avons remarqué que l'état de forme des neurones peut varier d'une culture à une autre et qu'une culture de neurones hippocampiques d'apparence saine (absence de débris, noyaux non condensés, corps cellulaires réfringents) pouvait ne pas être électriquement active.

L'endocytose des exosomes est probablement un phénomène actif dépendant de l'état de forme du neurone. On peut supposer que dans les expériences où nous n'avons pas observé d'internalisation, cela est dû à l'état général des neurones de la culture. Une autre hypothèse peut être formulée quant à la quantité d'exosomes incubés. Celle-ci pourrait jouer sur leur bonne internalisation. En effet, on peut supposer que plus il y a d'exosomes, plus ils auront tendance à faire des agrégats lors de leur purification, agrégats qui par la suite rendront difficile l'internalisation des exosomes. Pour le vérifier, il faudrait sur une même culture, incuber différentes quantités d'exosomes (plus ou moins dilués) et observer si cela induit une modification de l'internalisation.

ii. Quels mécanismes moléculaires régissent l'internalisation des exosomes par les neurones ?

Dans les expériences où nous avons pu étudier l'internalisation des exosomes, nous n'avons pas été en mesure d'observer des colocalisations entre les signaux GFP exosomaux et des compartiments de la voie endocytaire repérés avec les anticorps suivants : α EEA1, α LBPA, α Lamp1, α TfR. Il faudrait mieux caractériser la machinerie moléculaire mise en jeu lors de l'internalisation des exosomes GFP-CD63 car les cellules eucaryotes sont le siège de différents mécanismes d'endocytose : l'endocytose clathrine-dépendante (ECD), l'endocytose de type cavéolaire (ETC), l'endocytose Arf6-dépendante, et bien d'autres (Doherty and McMahon, 2009). De nos jours, différents outils sont mis à la disposition des chercheurs pour caractériser les nombreuses voies d'endocytose existantes. En 2002, Sara B. Sieczkarski et Gary R. Whittaker ont proposé une boîte à outils (*toolbox*) basée sur la littérature pour cibler telle ou telle voie d'endocytose en utilisant des agents pharmacologiques, des mutants, des toxines, etc. (Sieczkarski and Whittaker, 2002). Plusieurs voies d'endocytose mettent en jeu la dynamine, notamment l'ECD. Or en microscopie électronique, nous avons observé des vésicules ayant la taille et la forme des exosomes (mais non marquées) piégées dans des puits de clathrine (G. Lachenal). Afin de déterminer si la dynamine intervient dans l'internalisation des exosomes GFP-CD63, nous pourrions incuber les neurones avec du dynasore. Ce dernier inhibe la dynamine en bloquant son activité GTPase. L'expression d'un dominant-négatif comme le Dyn2K44A permettrait également de mettre hors jeu la dynamine. Celle-ci intervient dans l'ECD, la phagocytose mais également dans l'ETC. Si les exosomes GFP-CD63 sont internalisés via une endocytose de type cavéolaire (ETC), la surexpression d'un dominant négatif de la cavéoline, Cav1DN devrait la déstabiliser. Comme l'ETC fait intervenir les radeaux lipidiques, l'ajout de nystatine, de génistéine ou de filipine perturbe son déroulement. Il faudrait mesurer leur impact sur l'endocytose des exosomes. En outre, si les exosomes GFP-CD63 sont endocytés par des puits recouverts de clathrine, en mettant de la chlorpromazine (qui inhibe l'assemblage du manteau de clathrine) on devrait observer une réduction de l'endocytose des exosomes. De même si l'on fait s'exprimer un mutant tronqué de

Eps15, un composant des vésicules de clathrine. Par l'utilisation d'agents pharmacologiques et de plasmides, nous devrions être en mesure de déterminer si l'endocytose des exosomes GFP-CD63 fait intervenir la dynamine, la cavéoline et la clathrine.

Les virus Adéno-associés (*Adeno-associated viruses*, AAVs) sont des virus à ADN simple brin, non enveloppés, non pathogènes (aucune maladie connue ne leur est associée) qui montrent un grand potentiel en tant que vecteur de thérapie génique. Une étude de 2011 portant sur l'AAV2 a montré que l'infection par ce virus était indépendante de la dynamine et passait par la voie d'endocytose CLIC/GEEC (*clathrin-independent carriers/GPI-anchored-protein-enriched endosomal compartment*) (Nonnenmacher and Weber, 2011). L'infection par l'AAV2 est sensible à l'inhibition des trois principaux acteurs (connus) de la voie CLIC/GEEC : Arf1, une GTPase qui promeut la courbure membranaire (Kumari and Mayor, 2008), Cdc42, une GTPase qui favorise la polymérisation locale de l'actine (Chadda et al., 2007; Sabharanjak et al., 2002) et GRAF1 (*Rho GTPase activating protein*) responsable de la tubulation et de la scission des vésicules CLIC (Lundmark et al., 2008). La voie d'endocytose CLIC/GEEC est dépendante d'un cytosquelette d'actine non altéré et d'un cholestérol membranaire intact. Si l'endocytose des exosomes GFP-CD63 passe par la voie CLIC/GEEC, déstabiliser la polymérisation de l'actine (par un traitement à la cytochalasine D) ou le cholestérol membranaire (par l'emploi de methyl- β -cyclodextérine ou de filipine III) devrait perturber l'internalisation des exosomes. Il faut néanmoins se montrer prudent quant au prisme d'action de ces différents agents.

Dans l'étude de Nonnenmacher et Weber, les virions AAV2 internalisés se retrouvent dans des vésicules d'endocytose contenant également la GPI-GFP (une GFP à ancre GPI) et la sous-unité B de la toxine du choléra (CtxB) considérés comme des marqueurs de la voie CLIC/GEEC. Une co-incubation des exosomes GFP-CD63 avec la toxine du choléra serait envisageable afin de vérifier leur colocalisation par immunofluorescence. Néanmoins, dans cette étude, les auteurs remarquent qu'une partie des virions AAV2 subissent une endocytose dynamine-dépendante (Nonnenmacher and Weber, 2011). Nous ne sommes pas en mesure d'exclure la possibilité que les exosomes puissent être internalisés via divers mécanismes au sein d'une même cellule. L'utilisation de la microscopie électronique devrait permettre l'identification des compartiments intracellulaires dans lesquels se retrouvent les exosomes GFP-CD63.

De plus en plus d'études tendent à prouver que les exosomes sont un moyen de communication intercellulaire par transfert de protéines et d'ARN. Le transfert d'ARNm ou de microARN actifs dans le cytosol de la cellule réceptrice implique une fusion de l'exosome avec cette dernière (Kosaka et al., 2010; Valadi et al., 2007). Cette étape de fusion pourrait avoir lieu soit directement à la membrane

plasmique (Parolini et al., 2009) soit avec la membrane limitante de l'endosome après son endocytose (Morelli et al., 2004), on parle alors de *back fusion* (Falguieres et al., 2009). Enfin, il est également envisageable que les exosomes soient internalisés par phagocytose (Feng et al., 2010). En 2007, Bowen et al ont démontré que les neurones ont la capacité de phagocyter des débris cellulaires et des particules synthétiques (Bowen et al., 2007). On peut émettre l'hypothèse que les exosomes GFP-CD63 aient été phagocytés par les neurones en culture. Ceci expliquerait pourquoi la fluorescence GFP due aux exosomes n'est pas retrouvée dans des compartiments de la voie endocytaire repérés en immunofluorescence. Cependant, avec les molécules qu'ils présentent à leur surface, on peut également penser que les exosomes se fixent et sont endocytés de façon plus ciblée par les neurones.

De part leur petite taille et la probable rapidité des événements, il est très difficile d'étudier les mécanismes de fixation et d'endocytose des exosomes. Les exosomes neuronaux tout comme les exosomes de N2a présentent à leur surface la protéine d'adhésion L1_{CAM}. Il s'agit d'une molécule d'adhésion homophile (la molécule se fixe en trans à une autre molécule L1 de la surface cellulaire) uniquement exprimée par les neurones dans le SNC (Rathjen and Schachner, 1984). L1_{CAM} est donc un potentiel candidat pour médier l'adhésion et l'endocytose des exosomes par les neurones. Cependant, la fixation des exosomes de N2a GFP-CD63 doit être également médiée par d'autres molécules d'adhésion puisque ces exosomes se fixent aussi aux astrocytes qui, elles, n'expriment pas L1_{CAM}. Il serait intéressant de tester si la digestion des exosomes à la trypsine ou leur fixation en paraformaldéhyde abolit leur adhésion sur les neurones. Si c'est le cas, nous aurions la démonstration de l'implication d'une protéine exosomale dans le mécanisme de fixation. En 2004, une étude portant sur les exosomes de cellules dendritiques (DC) a montré l'implication de plusieurs molécules à la fois exosomales et cellulaires dans la fixation des exosomes aux DC. Du côté des exosomes, ont été impliqués : la phosphatidylsérine, le MGF-E8/Lactadhérine (*Milk Fat Globule*), CD11a, CD54, et les tétraspanines CD9 et CD81. Du côté des cellules, les intégrines $\alpha 5/\beta 3$ et CD11a et son ligand CD54 interviendraient dans la fixation des exosomes (Morelli et al., 2004). Clayton et al ont montré que les exosomes de lymphocytes B portaient les intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$ et que ces dernières étaient impliquées dans la fixation de ces exosomes au collagène, à la fibronectine et aux fibroblastes activés au (TNF)- α (Clayton et al., 2004). Segura et al ont démontré que la fixation des exosomes sur les cellules dendritiques passerait par une interaction entre ICAM-1 (abondamment présent sur les exosomes de cellules dendritiques) et son récepteur LFA-1 sur les cellules dendritiques (Segura et al., 2007). Il serait intéressant d'établir le catalogue des protéines d'adhésion (cadhérines, intégrines en particulier) qui sont présentes sur les exosomes puis vérifier leur implication potentielle dans les phénomènes de fixation exosomale.

L'enrichissement de la tétraspanine CD63 (et de GFP-CD63) dans les exosomes n'est peut-être pas anodin. Les tétraspanines fonctionnent comme des organisateurs de la surface cellulaire en recrutant des partenaires protéiques spécifiques dans des microdomaines enrichis en tétraspanines (TEM, *tetraspanin enriched microdomains*), qui régissent des processus comme l'adhésion cellulaire, la signalisation et le trafic intracellulaire. La tétraspanine CD63 est enrichie dans des TEM membranaires mais également dans des compartiments intracellulaires, dans les MVE et les lysosomes (Bailey et al., 2011; Pols and Klumperman, 2009). Au niveau de la membrane des cellules endothéliales, les tétraspanines CD9 et CD151 augmentent la capture de leucocytes en promouvant le regroupement (*clustering*) de molécules d'adhésion IgSF ICAM-1 et VCAM-1 (Barreiro et al., 2005; Barreiro et al., 2008). Quant à CD63, elle augmenterait également la capture de leucocytes par *clustering* de la P-sélectine (Doyle et al., 2011). Enfin, l'angiogénèse pathologique requiert CD151, par un mécanisme qui impliquerait sa capacité à réguler des intégrines se fixant à la laminine, comme $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ and $\alpha 6\beta 4$ (Liu et al., 2011; Takeda et al., 2007). Il existe donc de nombreuses pistes afin de mieux comprendre les mécanismes régissant la fixation et l'internalisation des exosomes par les neurones.

2. Exosomes GFP-TTC neuronaux

i. Les exosomes neuronaux, vecteurs de la toxine du tétanos ?

La toxine du tétanos (TeNT), produite par *Clostridium tetani* et la toxine botulinique, produite par *Clostridium botulini*, appartiennent à la famille des neurotoxines clostridiales. Ces dernières partagent une structure commune composée d'une chaîne lourde (100 kDa) et d'une chaîne légère (50 kDa) reliées par un pont disulfure et des interactions non-covalentes (Caleo and Schiavo, 2009). La chaîne lourde est responsable de la fixation et de l'internalisation dans les neurones, tandis que la chaîne légère est responsable de l'activité métalloprotéasique intracellulaire. L'intoxication des neurones par ces toxines entraîne l'hydrolyse des protéines SNARE (synaptobrevine II, syntaxine ou SNAP-25, selon la toxine), ce qui se traduit par le blocage de la libération de neurotransmetteurs. Ces neurotoxines clostridiales ont contribué à l'analyse fonctionnelle de la libération des neurotransmetteurs et à l'identification du rôle central joué par les SNARE (Niemann et al., 1994). De plus, la TTC (l'extrémité C-terminale de la chaîne lourde de la toxine tétanique assurant son transport mais qui n'est pas toxique) a été utilisée comme un marqueur du transport rétrograde (Price et al., 1975; Schwab et al., 1979). Elle a par ailleurs été utilisée pour le ciblage et la livraison de protéines exogènes dans le SNC (Bordet et al., 2001; Coen et al., 1997). Malgré toutes ses applications, aucune information précise n'est disponible sur le mécanisme moléculaire utilisée par la TeNT pour passer du motoneurone à l'interneurone. Nous avons émis l'hypothèse que la toxine soit libérée par le

neurone moteur en association avec des exosomes qui seraient repris localement par les interneurones, dans lesquels la TeNT entrerait ensuite en action en clivant la synaptobrevine II.

Nos travaux suggèrent fortement que la TeNT transiterait de neurone en neurone via les exosomes :

1) Nous avons montré que la partie C-terminale de la toxine couplée à la GFP est endocytée par les neurones corticaux. En immunofluorescence, nous l'avons vue colocaliser avec des compartiments endosomaux précoces marqués avec un anti-EEA1. En microscopie électronique (ME), nous l'avons repérée dans des MVE.

2) Nous avons montré en ME et en Western blot que la GFP-TTC est sécrétée par voie exosomale à partir de cultures primaires de neurones corticaux.

3) En microscopie confocale, nous avons démontré que les exosomes transportant la TTC pouvaient être recaptés par des neurones receveurs.

Non seulement les exosomes transportent la TTC mais en plus, leur devenir est influencé par ce cargo. Nous avons observé que, contrairement aux exosomes de N2a GFP-CD63, les exosomes véhiculant la GFP-TTC ne se fixent pas à tous les neurones, ne se fixent pas aux cellules gliales et se fixent préférentiellement au niveau des extrémités pré-synaptiques. Ils ont donc le même comportement que la TTC qui, elle-même se comporte comme la toxine entière. Nos observations laissent penser que la toxine entière pourrait tourner à son avantage une voie physiologique de transfert trans-synaptique de matériel entre les neurones, les exosomes.

Les différences que nous avons perçues s'établissent entre des exosomes neuronaux transportant la TTC et des exosomes de N2a exprimant GFP-CD63. Pour confirmer que la TTC influence le comportement des exosomes neuronaux en terme de spécificité de fixation intercellulaire et subcellulaire, il faudrait maintenant travailler avec des exosomes provenant des mêmes cellules sécrétrices : neurone/neurone ou N2a/N2a. En 2002, Kissa *et al* ont transfecté des cellules N2a afin de produire de la GFP-TTC. En réalisant une co-culture de N2a transfectées GFP-TTC avec des neurones naïfs, les auteurs ont observé un passage de la fluorescence des cellules N2a vers les neurones par un mécanisme qu'ils n'ont pas déterminé (Kissa *et al.*, 2002). On est en droit d'imaginer que ce passage de fluorescence s'est effectué par la réception d'exosomes contenant la GFP-TTC. Nous pourrions imaginer transfecter notre lignée N2a GFP-CD63 avec un plasmide codant pour la RFP-TTC, purifier leurs exosomes, vérifier leur contenu en Western blot et les incuber sur des neurones receveurs. Ce type d'expérience permettrait de confirmer l'influence du cargo TTC sur le devenir des exosomes.

Nos expériences réalisées *in vitro* demandent à être consolidées par une approche *in vivo*. Or, il a été montré que la TTC injectée au niveau de l'hippocampe en CA1, est capable de passage trans-synaptique rétrograde puisqu'elle est retrouvée au niveau des fibres moussues de la voie tri-synaptique (Maskos et al., 2002). Notre hypothèse de travail est que ce transport s'effectue par la voie des exosomes. Dans le laboratoire, Fiona Hemming en collaboration avec Tanguy Chabrol (équipe 9, GIN) a mis au point des injections stéréotaxiques de TTC couplée à la HRP (*Horseradish Peroxidase*) chez des rats. Le principe étant d'injecter la HRP-TTC dans la région dorsale de CA1 et de suivre son transfert rétrograde en CA3, grâce à son activité peroxydase. Pour cela, des coupes de la région comprenant les synapses entre la partie CA3 et les fibres moussues sont observées en ME. En collaboration avec Karin Pernet-Gallay (plateforme ME, GIN), F. Hemming a pu observer dans le CA3 éloigné du site d'injection, des MVE assombris par la présence de HRP-TTC dans leurs ILV, côtoyant des MVE clairs non marqués. De même, des vésicules ayant la taille et la forme des exosomes semblaient présenter un marquage sombre dû à l'activité peroxydase. Ces observations nous confortent dans l'idée que la TeNT transiterait via les exosomes *in vivo*. Néanmoins, ces résultats très encourageants doivent être interprétés avec beaucoup de précaution : il est parfois difficile d'affirmer que le signal sombre observé correspond bien à la révélation de la HRP. A l'heure actuelle, F. Hemming met au point le même genre d'expérience mais cette fois avec l'injection de GFP-TTC observée en microscopie biphotonique (coll. Florence Appaix, plateforme microscopie, GIN).

Dans des expériences ultérieures, il sera important de travailler avec la toxine entière incubée sur des motoneurons pour être au plus près de ses conditions d'entrée physiologiques. Il faudra tester la sécrétion exosomale de la toxine entière par les neurones moteurs. Il sera alors possible de vérifier que la toxine associée aux exosomes peut être reprise par d'autres neurones et y cliver la synaptobrevine II.

ii. Le côté obscur des exosomes

Nos observations nous poussent à penser que les exosomes neuronaux pourraient être un vecteur d'agents pathogènes, notamment pour la TeNT. En effet, si les exosomes neuronaux peuvent apparaître aujourd'hui comme un moyen d'échange physiologique au sein du système nerveux, de nombreux groupes ont relié ces vésicules au transport de molécules pathogènes, telles que le prion. Le prion est l'agent infectieux responsable de maladies neurodégénératives comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob chez l'homme et l'encéphalopathie spongiforme bovine chez le bétail. Chez l'homme ont été identifiées des formes familiales de la maladie mais toutes les formes sont transmissibles par voie sanguine ou digestive.

Ces dix dernières années ont vu émerger plusieurs études montrant la présence des protéines Prp-c (forme cellulaire normale) et Prp-sc (*scrapie*, isoforme muté pathogène) dans les exosomes sécrétés par différentes lignées cellulaires (Alais et al., 2008; Fevrier et al., 2004; Vella et al., 2007). En outre, il a été démontré que les exosomes porteurs de la protéine Prp-sc sont infectieux car ils induisent la conversion de la Prp cellulaire en *scrapie* dans une lignée cellulaire en culture, et la mort des souris auxquelles ils ont été injectés, suite à des désordres neurologiques (Fevrier et al., 2004). La présence de Prp-c dans les exosomes de neurones (Faure et al., 2006) et dans le liquide céphalo-rachidien (Vella et al., 2008) renforce le rôle hypothétique des exosomes comme moyen de propagation de l'infection dans le SNC.

Alors que ses effets ne sont visibles qu'au niveau des neurones du SNC, l'infection par le prion passe par l'alimentation ou le sang, ce qui reflète le transfert du prion de la périphérie vers le SNC. La propagation de la protéine pathogène depuis la périphérie vers le SNC pourrait se produire soit à partir du système nerveux périphérique, par exemple au niveau de la jonction neuromusculaire, soit à partir du flux sanguin directement vers le SNC, ce qui nécessiterait un passage de la protéine à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE). Or, le passage d'exosomes à travers la BHE a été mis en évidence lors de la purification d'exosomes dérivés de tumeurs cérébrales dans le plasma sanguin des patients (Graner et al., 2009). Les exosomes pourraient donc être le moyen de propagation du prion à la fois de la périphérie au SNC, puis à l'intérieur même du SNC.

Une étude datant de 2009 suggère que la protéine Prp-sc pourrait également être transférée d'une cellule à une autre en passant par des nanotubes (Gousset et al., 2009). Les nanotubes sont de fins prolongements de membrane plasmique contenant de l'actine qui forment un pont entre deux cellules. L'établissement de ces nanotubes permet aux cellules ainsi reliées d'échanger des composés membranaires et cytoplasmiques (Belting and Wittrup, 2008). On peut imaginer qu'il existe plusieurs voies de propagation de l'infection, les nanotubes pour une transmission locale et les exosomes pour une propagation à la fois locale et « longue-distance ».

En plus de la TeNT et du prion, les exosomes participeraient à la propagation de certaines pathologies neurodégénératives comme les tauopathies, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (Bellingham et al., 2012). Dans notre laboratoire, Karine Laulagnier s'intéresse à la sécrétion exosomale dans le contexte de la maladie d'Alzheimer.

Nos études de recapture des exosomes par les neurones en culture renforcent l'hypothèse selon laquelle les exosomes neuronaux sont un moyen de communication intercellulaire physiologique dans le système nerveux qui peut avoir des conséquences pathologiques.

III. Les exosomes neuronaux transportent des ARN

Afin de pouvoir affirmer que les exosomes sont effectivement un moyen de communication intercellulaire dans le système nerveux, il nous fallait démontrer qu'ils peuvent être recapturés par les neurones et qu'ils transportent des molécules informatives susceptibles d'être utilisées par les neurones receveurs. Dans cette optique, nous nous sommes penchés sur le contenu en ARN des exosomes. Nous avons à la fois travaillé sur les exosomes de N2a et sur les exosomes de neurones corticaux. Dans ce domaine, les travaux de Valadi *et al* sont considérés comme précurseurs puisqu'ils démontrent que non seulement les exosomes de mastocytes contiennent des ARN mais en plus que ces derniers sont biologiquement fonctionnels dans les cellules réceptrices (Valadi *et al.*, 2007). Depuis, plusieurs études sont venues corroborer la découverte de Jan Lötvald et son équipe, ouvrant un nouveau champ de recherche sur les exosomes en tant que moyen de communication intercellulaire (Kogure *et al.*, 2011; Kosaka *et al.*, 2010; Montecalvo *et al.*, 2012; Pegtel *et al.*, 2010; Skog *et al.*, 2008).

1. Les exosomes, une voie de sécrétion pour les ARN

Au cours de ma thèse, nous avons procédé à l'isolation d'ARN à partir d'exosomes de N2a à l'aide de plusieurs méthodes d'extraction (*Trizol* Invitrogen, couplage des kits *miRNeasy mini* et *RNeasy Micro* Qiagen, kit *RNeasy Mini* Qiagen, kit *mirVana miRNA isolation* Ambion). Pour chaque type d'extraction, nous avons établi le profil Bioanalyser Agilent 2100 qui permet de distinguer par leur taille les différents ARN en présence. Quelle que soit la technique d'isolation employée, nous avons obtenu globalement le même profil caractérisé par l'absence d'ARN ribosomiques et la présence d'ARN majoritairement courts (des microARN et des ARNm probablement). En effet, d'après la Figure 49, la majorité des ARN présents ont une taille inférieure ou égale à 200 nucléotides (200 nt). Au-delà, le profil s'étire, démontrant la présence d'ARN plus longs (jusqu'à 1000 nt environ) mais en beaucoup plus faible quantité. Par la suite, pour les expériences de RT-q-PCR, nous nous sommes focalisés sur les microARN (miR) et avons utilisé un protocole spécialisé dans la récupération des ARN courts limitée en quantité (kit Qiagen *miRNeasy mini kit* en suivant l'*appendix* concernant les ARN de petite taille : microARN et ARN < 200 nt). En choisissant de se concentrer sur les petits ARN, nous ne nous donnons pas la possibilité de repérer la présence d'ARN plus grands. C'est un élément à prendre en compte lorsque l'on analyse les profils obtenus grâce au Bioanalyser : le kit employé a un impact sur les ARN observés. Ceci a d'ailleurs fait l'objet d'une publication en 2012 dans laquelle Maria Eldh *et al* ont comparé les profils Bioanalyser obtenus en fonction du kit d'extraction employé (Eldh *et al.*, 2012). Ils ont démontré que la quantité et la nature des ARN isolés à partir du même type

d'exosomes variaient en fonction de la technique d'extraction choisie, certaines privilégiant les ARN petits, d'autres les longs.

Après avoir travaillé avec des culots 100 000 g d'exosomes de N2a et de neurones corticaux, nous avons voulu aller plus loin dans notre démonstration en déposant ce culot 100 000 g sur un gradient continu de sucrose. Il nous fallait confirmer que les ARN repérés dans le culot étaient bien contenus dans des exosomes et non dans d'autres types de vésicules. En effet, les exosomes ne sont pas les seules vésicules extracellulaires contenant des ARN pouvant être sécrétées par des cellules. Ainsi en 2006, une étude portant sur des microvésicules membranaires (MVM) de cellules souches embryonnaires a montré que les MVM contenaient des ARN et notamment des ARNm codant pour des facteurs de transcription. Les auteurs ont démontré que ces ARNm pouvaient être délivrés par les MVM à des cellules cibles dans lesquelles ils ont été traduits (Ratajczak et al., 2006). De surcroît, Zernecke *et al* ont démontré que les corps apoptotiques dérivés de cellules endothéliales contiennent le miR126 qui, ainsi délivré aux cellules environnantes, induit la production de la chimiokine CXCL12. Cette dernière est impliquée dans des mécanismes protecteurs contre l'artériosclérose (Zernecke et al., 2009). En séparant les exosomes neuronaux sur un gradient continu de sucrose, nous avons démontré que les petits ARN repérés préalablement dans le culot 100 000 g se concentrent dans les fractions exosomales. Les neurones corticaux sécrètent dans leur milieu extracellulaire des ARN par la voie des exosomes.

2. Les exosomes neuronaux contiennent des ARN parmi lesquels, des microARN

Parmi les ARN courts (<200 nt) isolés à partir des fractions exosomales se trouvent des microARN. Il s'agit de petits ARN (~22 nt) non codants impliqués dans la régulation génique en empêchant la traduction ou en dégradant un grand nombre d'ARNm simultanément, ce qui en fait de puissants régulateurs de l'expression des gènes. Leur capacité à dégrader un ARNm cible passe par la reconnaissance de sites complémentaires imparfaits, situés dans la région 3'-UTR non traduite (*untranslated region*) de l'ARNm visé. En outre, un microARN possède plusieurs ARNm cibles et un même ARNm peut être la cible de différents microARN. Ces derniers exercent leur activité régulatrice sur leur ARNm cibles au sein d'un complexe protéique dénommé RISC (*RNA-induced silencing complex*). Découverts pour la première fois en 1993 chez *C. elegans*, les microARN sont désormais massivement étudiés chez les plantes et les animaux car leur pouvoir de régulation apparaît tout aussi fin que puissant (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Dans le système nerveux des mammifères, le contrôle spatiotemporel de la traduction des ARNm joue un rôle important dans le développement et la plasticité synaptique (Swanger and Bassell, 2011). En 2005, l'étude pionnière

menée par Giraldez *et al* a démontré que la voie de régulation par les microARN était essentielle dans les premières étapes de développement du cerveau du poisson-zèbre (Giraldez *et al.*, 2005). Depuis, quelques 300 microARN ont été isolés à partir du système nerveux des vertébrés (Ling *et al.*, 2011; Podolska *et al.*, 2011). A l'heure actuelle, les microARN ont été impliqués dans la morphogénèse et le fonctionnement du cerveau et incriminés dans des maladies neurodégénératives, développementales et des troubles du comportement (Im and Kenny, 2012; Schratt, 2009).

Nous avons identifié sur plaques TLDA (TaqMan Low Density Array) 186 microARN présents dans les exosomes de N2a dont 170 en commun avec les cellules. Les 16 microARN (miR) retrouvés uniquement dans les exosomes pourraient être soit le reflet d'un enrichissement tout particulier dans les vésicules, soit le reflet de la limite de détection de cette technique. La présence de ces 16 miR dans les exosomes et non dans leurs cellules sécrétrices n'est pas une observation isolée. Par exemple, Kogure *et al* ont détecté 11 miR exclusivement présents dans les exosomes sécrétés (11 sur 134) par des cellules Hep3B ce qui, selon les auteurs, traduit un enrichissement conséquent de ces miR dans les exosomes par rapport aux cellules sécrétrices (Kogure *et al.*, 2011). L'enrichissement notoire des exosomes en certains microARN pourrait être la conséquence d'une sélection active des cargos nucléiques à exporter par voie exosomale. Il est également possible que les miR empaquetés dans les ILV (futurs exosomes) soient à l'abri de la dégradation subie par les miR restés dans le cytoplasme cellulaire. A contrario, certains miR identifiés dans les cellules N2a ne sont pas retrouvés dans leurs exosomes, ce qui suggère que tous les microARN cellulaires ne sont pas adressés aux exosomes.

Parmi les microARN identifiés dans les exosomes de N2a, cinq miR ont retenu notre attention : miR138, miR132, miR328, miR298, miR137. Ces miR ont été directement impliqués dans des phénomènes de régulation génique physiologique et pathologique dans les neurones. Le miR138 intervient dans la morphogénèse des épines dendritiques (Siegel *et al.*, 2009) et il a été relié à la maladie de Huntington car sa biogénèse est anormale dans des modèles murins de cette maladie neurodégénérative (Lee *et al.*, 2011). Il en est de même pour le miR 132 (Lee *et al.*, 2011) qui est également dérégulé dans la schizophrénie (Kim *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2012). Par ailleurs, le miR132 régule la morphogénèse neuronale (Edbauer *et al.*, 2010; Vo *et al.*, 2005) et il est essentiel pour la plasticité du cortex visuel (Mellios *et al.*, 2011). Les miR 298 et 328 ont été reliés à la maladie d'Alzheimer. En effet, ils reconnaissent des sites de liaison spécifiques au niveau de l'extrémité 3'-UTR de l'ARNm de BACE1 (Beta-secretase 1) et réguleraient ainsi l'expression de cette enzyme impliquée dans la formation des peptides β -amyloïdes pathogènes (Boissonneault *et al.*, 2009). Quant au miR137, il participe à la régulation de la maturation neuronale (Smrt *et al.*, 2010) et parmi

ses ARNm cibles, et donc les gènes correspondants, se trouvent des gènes associés à la schizophrénie (Kim et al., 2012). Leur présence dans les exosomes fait de ces derniers de potentiels convoyeurs pour ces puissants régulateurs de l'expression génique.

Nous avons décidé de nous focaliser dans un premier temps sur deux microARN présents dans les exosomes de N2a, les miR132 et miR138, et de vérifier leur présence dans les exosomes de neurones corticaux. En collaboration avec Hélène Ipas (Equipe 7, GIN), nous avons réalisé des RT-q-PCR sur des lysats et des exosomes de N2a en parallèle de lysats de neurones corticaux et de leurs exosomes et cela, avec les amorces spécifiques pour les microARN matures miR132 et miR138. Nous sommes ainsi parvenus à démontrer que ces deux miR étaient présents dans les exosomes neuronaux et présentaient un enrichissement différent. Les exosomes sécrétés par les neurones corticaux à 15 DIV contiennent plus de miR132 que de miR138 alors que dans les neurones, le miR138 est relativement enrichi par rapport au miR132. Ces différences témoignent d'une sélection des miR chargés dans les exosomes.

3. Quels mécanismes régissent l'adressage des ARN dans les exosomes ?

Jusqu'à présent, nous ne savons pas s'il existe un mécanisme cellulaire responsable de l'adressage des ARN, parmi lesquels des miR, dans les vésicules intraluminales des endosomes multivésiculés. Néanmoins, les différences observées entre miR d'une même population exosomale et les différences notées entre les cellules sécrétrices et leurs exosomes suggèrent l'existence d'un tel mécanisme. En 2009, Gibbings *et al* ont montré que le *knockdown* de protéines ESCRT ou de protéines associées aux ESCRT, parmi lesquelles Alix, Vps36 et Hrs, perturbe le fonctionnement de ce complexe et a pour conséquence l'inhibition de l'activité de « *silencing* » des miR cellulaires (Gibbings et al., 2009). Dans cette étude, les protéines GW182 et Argonaute 2 (membres de la machinerie RISC), des ARNm et des miR ont été retrouvés associés aux MVE et sécrétés dans les exosomes. Publiée simultanément (mais indépendamment) l'étude de Lee *et al* a également montré que les MVE sont des sites privilégiés du *silencing* médié par les microARN. Leurs travaux suggèrent que la machinerie RISC est associée physiquement et fonctionnellement aux MVE (Lee et al., 2009). Par ailleurs, dans le laboratoire, nous avons constaté en Western blot la sécrétion de la protéine GW182 dans des exosomes de N2a séparés sur gradient de sucrose (données non montrées).

D'après les travaux de Gibbings *et al* et Lee *et al*, il semblerait que les MVE soient une plateforme où le complexe ESCRT s'associe à la machinerie RISC, ce qui permet la régulation des ARNm par les miR au niveau du MVE. On est en droit de supposer que l'adressage des miR dans les ILV (les futurs exosomes) est contrôlé par l'association MVE-RISC. Récemment, l'équipe d'Olivier Voinnet a publié que la protéine du prion cellulaire Prp-c participerait au recrutement de la protéine Ago2 (Argonaute

2) au niveau de la membrane du MVE (Gibbings et al., 2012). La protéine Prp-c, présente notamment dans les exosomes neuronaux, participe peut-être à l'adressage des ARN dans les exosomes. Il reste encore beaucoup à découvrir sur les mécanismes régissant l'incorporation de miR dans les exosomes mais pas à pas, la recherche progresse.

4. Fonction des ARN exosomaux dans le système nerveux ?

Nous avons démontré par RT-q-PCR la présence des microARN matures miR132 et 138 dans les exosomes de neurones corticaux à 15DIV. Le miR138, présent dans les épines dendritiques, contribue à diminuer leur taille et régule négativement l'expression de surface des récepteurs AMPA, affectant ainsi la transmission synaptique (Siegel et al., 2009). Le miR132 est impliqué dans la morphogénèse neuronale. La protéine CREB (*cAMP-response element binding protein*), qui participe au développement axonal et dendritique, régule la transcription du miR132. Lorsque celui-ci s'exprime, il promeut la poussée neuritique (Vo et al., 2005). La sécrétion de ces deux microARN par la voie des exosomes neuronaux pourrait contribuer grandement à modifier l'arborisation dendritique et l'efficacité des synapses.

Il faudrait maintenant établir la liste complète des ARN transportés par les exosomes neuronaux. De plus, il serait intéressant d'identifier les miR présents dans les exosomes sécrétés par des neurones en développement comparés à ceux retrouvés dans les exosomes de neurones matures. En effet, de nombreux miR ont été impliqués dans la morphogénèse neuronale et il est attrayant de penser que de tels miR pourraient être enrichis dans les exosomes de neurones jeunes comparés à des exosomes sécrétés par des neurones matures. Ainsi, Montecalvo *et al* ont observé des différences d'enrichissement en miR entre les exosomes sécrétés par des cellules dendritiques immatures *versus* des cellules dendritiques rendues matures par traitement au LPS (lipopolysaccharide). Les auteurs ont montré que, comparé aux exosomes de cellules dendritiques immatures, les exosomes matures contiennent plus de miR125b-5p, miR146a, et de miR148, tous trois des répresseurs d'ARNm pro-inflammatoires (Montecalvo et al., 2012). On est en droit de penser que les microARN présents dans les exosomes neuronaux participent à la physiologie et au bon fonctionnement du système nerveux et que leur adressage dans les exosomes varie au cours du temps.

Nous avons constaté par RT-q-PCR que la surexpression du pré-miR138 dans les cellules N2a provoquait l'enrichissement du miR138 mature dans les exosomes sécrétés. Les amorces spécifiques du miR mature utilisées pour la RT nous garantissent qu'il s'agit bien du miR138 et non de son pré-miR. Nous sommes donc en mesure d'affirmer que la transfection a permis un enrichissement du miR mature dans les exosomes (et les cellules) mais nous ne pouvons rien conclure quant au pré-miR. Dans nos expériences, les techniques de détection employées ne nous permettent pas de savoir si les

pré-miR sont également chargés dans les exosomes. Comme dans tout domaine de recherche, les découvertes sur les exosomes vont de pair avec les avancées techniques permettant de les étudier. Ainsi, nos analyses sur le contenu en ARN des exosomes neuronaux laissent penser que ces derniers ne contiennent pas d'ARN ribosomiques et renferment majoritairement des ARN courts, parmi lesquels se trouvent très probablement des ARNm et des microARN. Ces observations concordent avec les données de la littérature actuelle mais elles sont également le reflet d'une certaine limitation technique. Les travaux de Nolte-'t Hoen *et al* sur des exosomes de cellules dendritiques laissent penser que les exosomes contiennent de nombreux types d'ARN différents identifiés avec des techniques de pointe (Nolte-'t Hoen *et al.*, 2012). Il nous reste donc encore beaucoup de choses à apprendre sur les cargos nucléiques des exosomes : leur nature exacte, les mécanismes régissant leur adressage dans les ILV et leur(s) rôle(s) physiologique(s).

Nos observations sur la transfection du pré-miR138 qui induit un enrichissement notable du miR138 mature dans les exosomes sécrétés montre qu'il est possible d'enrichir artificiellement des exosomes en un miR d'intérêt. Il serait maintenant intéressant de tester l'incubation de ces exosomes enrichis en miR138 sur des neurones en culture afin de voir l'effet de ce miR apporté par la voie exosomale. Pour cela, nous avons d'ores et déjà récupéré des constructions plasmidiques codant pour des rapporteurs bicistroniques que nous avons obtenus de G. Schratt (Marburg, Allemagne) (Siegel *et al.*, 2009). L'utilisation de neurones d'hippocampe préalablement transfectés avec ces vecteurs d'expression permettrait de visualiser en fluorescence l'effet des miR exosomaux sur les neurones receveurs. Dans le laboratoire, Sandrine Fraboulet a vérifié l'effet d'un microARN (le miR146) contenu dans des exosomes de cellules COS transfectées dans un système cellulaire impliquant un rapporteur luciférase. Enfin, les miR132 et 138 ayant un effet visible sur la morphologie neuronale, il serait possible de visualiser l'effet des exosomes contenant ces miR sur l'arborisation dendritique et sur la taille et la forme des épines (analyses à l'aide de *Neuronstudio* (Belly *et al.*, 2010)). Ces travaux sont désormais repris par Charlotte Javalet, en thèse dans le laboratoire depuis le 1^{er} Octobre 2012. Charlotte s'intéresse également au contenu en ARN messager des exosomes neuronaux. La présence d'ARNm a notamment été démontrée dans des exosomes de mastocytes et de cellules tumorales (Hong *et al.*, 2009; Skog *et al.*, 2008; Valadi *et al.*, 2007). Dans le système nerveux, des études ont montré que le pool d'ARNm localisés à proximité des densités post-synaptiques (PSD) est enrichi en certaines populations par rapport aux ARNm totaux répartis dans le neurone. Des ARNm sont transportés puis traduits à proximité de la PSD, en réponse à une activation de la synapse (Suzuki *et al.*, 2007), comme par exemple l'ARNm de la CamKII (Calmoduline kinase II), une enzyme qui participe à l'établissement de la LTP (Havik *et al.*, 2003). Il serait intéressant de comparer le profil des ARNm présents dans les exosomes à celui des ARNm présents vers la PSD, et ce, en fonction de

l'activité des récepteurs synaptiques au glutamate. Les exosomes pourraient servir à enrichir certaines synapses en ARNm, en réponse à une stimulation.

Actuellement, la plupart des études sur les échanges d'ARN entre cellules via les exosomes sont réalisées *in vitro* et l'on pourrait soulever l'interrogation de leur pertinence physiologique notamment en termes de quantité d'exosomes nécessaire pour observer un effet sur les cellules receveuses. En détectant la présence de milliers de copies de microARN différents dans seulement 0,5 ng d'ARN exosomaux, Pegtel *et al* considèrent ces chiffres physiologiquement pertinents puisque la quantité minimale de microARN nécessaire pour réprimer un ARNm cible est d'environ 100 copies dans les cellules de mammifères (Brown *et al.*, 2007a; Pegtel *et al.*, 2010).

Par un apport de matériel à la fois protéique, lipidique et nucléique, les exosomes neuronaux pourraient participer au fonctionnement du système nerveux dans des conditions normales et pathologiques. En effet, les exosomes représenteraient un mécanisme idéal pour le transfert inter-neuronal d'informations permettant une signalisation à la fois rétrograde et antérograde entre les synapses. Les exosomes neuronaux pourraient ainsi participer à la plasticité synaptique. Cependant, la détection dans les exosomes de protéines pathogènes telles que le prion ou l' α -synucléine, et de microARN impliqués dans des maladies neurologiques laisse penser que ces vésicules pourraient aussi être des convoyeurs pathogéniques. Le passage trans-synaptique via les exosomes de tels protéines et ARN pathogènes serait l'une des clés de la propagation de pathologies neurodégénératives au sein du système nerveux. La découverte et l'étude des exosomes neuronaux constituent donc une ouverture importante dans la compréhension du système nerveux physiologique et pathologique.

Références bibliographiques

- Abulrob, A., Tauskela, J.S., Mealing, G., Brunette, E., Faid, K. and Stanimirovic, D. (2005) Protection by cholesterol-extracting cyclodextrins: a role for N-methyl-D-aspartate receptor redistribution. *J Neurochem*, **92**, 1477-1486.
- Abusamra, A.J., Zhong, Z., Zheng, X., Li, M., Ichim, T.E., Chin, J.L. and Min, W.P. (2005) Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. *Blood Cells Mol Dis*, **35**, 169-173.
- Acconcia, F., Sigismund, S. and Polo, S. (2009) Ubiquitin in trafficking: the network at work. *Exp Cell Res*, **315**, 1610-1618.
- Adams, D.J., Callaghan, B. and Berecki, G. (2012) Analgesic conotoxins: block and G protein-coupled receptor modulation of N-type (Ca(V) 2.2) calcium channels. *Br J Pharmacol*, **166**, 486-500.
- Admyre, C., Grunewald, J., Thyberg, J., Gripenback, S., Tornling, G., Eklund, A., Scheynius, A. and Gabrielsson, S. (2003) Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. *Eur Respir J*, **22**, 578-583.
- Admyre, C., Johansson, S.M., Qazi, K.R., Filen, J.J., Lahesmaa, R., Norman, M., Neve, E.P., Scheynius, A. and Gabrielsson, S. (2007) Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol*, **179**, 1969-1978.
- Alais, S., Simoes, S., Baas, D., Lehmann, S., Raposo, G., Darlix, J.L. and Leblanc, P. (2008) Mouse neuroblastoma cells release prion infectivity associated with exosomal vesicles. *Biol Cell*, **100**, 603-615.
- Altick, A.L., Baryshnikova, L.M., Vu, T.Q. and von Bartheld, C.S. (2009) Quantitative analysis of multivesicular bodies (MVBs) in the hypoglossal nerve: evidence that neurotrophic factors do not use MVBs for retrograde axonal transport. *J Comp Neurol*, **514**, 641-657.
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhal, S. and Wood, M.J. (2011) Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol*, **29**, 341-345.
- Amzallag, N., Passer, B.J., Allanic, D., Segura, E., Thery, C., Goud, B., Amson, R. and Telerman, A. (2004) TSAP6 facilitates the secretion of translationally controlled tumor protein/histamine-releasing factor via a nonclassical pathway. *J Biol Chem*, **279**, 46104-46112.
- Andre, F., Escudier, B., Angevin, E., Tursz, T. and Zitvogel, L. (2004) Exosomes for cancer immunotherapy. *Ann Oncol*, **15 Suppl 4**, iv141-144.
- Andre, F., Scharztz, N.E., Chaput, N., Flament, C., Raposo, G., Amigorena, S., Angevin, E. and Zitvogel, L. (2002a) Tumor-derived exosomes: a new source of tumor rejection antigens. *Vaccine*, **20 Suppl 4**, A28-31.
- Andre, F., Scharztz, N.E., Movassagh, M., Flament, C., Pautier, P., Morice, P., Pomel, C., Lhomme, C., Escudier, B., Le Chevalier, T., Tursz, T., Amigorena, S., Raposo, G., Angevin, E. and Zitvogel, L. (2002b) Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet*, **360**, 295-305.
- Arantes, R.M. and Andrews, N.W. (2006) A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons. *J Neurosci*, **26**, 4630-4637.
- Arita, S., Baba, E., Shibata, Y., Niino, H., Shimoda, S., Isobe, T., Kusaba, H., Nakano, S. and Harada, M. (2008) B cell activation regulates exosomal HLA production. *Eur J Immunol*, **38**, 1423-1434.
- Babst, M., Katzmman, D.J., Estepa-Sabal, E.J., Meerloo, T. and Emr, S.D. (2002a) Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell*, **3**, 271-282.
- Babst, M., Katzmman, D.J., Snyder, W.B., Wendland, B. and Emr, S.D. (2002b) Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell*, **3**, 283-289.

- Babst, M., Wendland, B., Estepa, E.J. and Emr, S.D. (1998) The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *Embo J*, **17**, 2982-2993.
- Bache, K.G., Brech, A., Mehlum, A. and Stenmark, H. (2003) Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol*, **162**, 435-442.
- Bacia, K., Schwille, P. and Kurzchalia, T. (2005) Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 3272-3277.
- Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P. and David, G. (2012) Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol*, **14**(7):677-85
- Bailey, R.L., Herbert, J.M., Khan, K., Heath, V.L., Bicknell, R. and Tomlinson, M.G. (2011) The emerging role of tetraspanin microdomains on endothelial cells. *Biochem Soc Trans*, **39**, 1667-1673.
- Bakhti, M., Winter, C. and Simons, M. (2011) Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. *J Biol Chem*, **286**, 787-796.
- Barreiro, O., Yanez-Mo, M., Sala-Valdes, M., Gutierrez-Lopez, M.D., Ovalle, S., Higginbottom, A., Monk, P.N., Cabanas, C. and Sanchez-Madrid, F. (2005) Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. *Blood*, **105**, 2852-2861.
- Barreiro, O., Zamai, M., Yanez-Mo, M., Tejera, E., Lopez-Romero, P., Monk, P.N., Gratton, E., Caiolfa, V.R. and Sanchez-Madrid, F. (2008) Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplateforms. *J Cell Biol*, **183**, 527-542.
- Beattie, E.C., Carroll, R.C., Yu, X., Morishita, W., Yasuda, H., von Zastrow, M. and Malenka, R.C. (2000) Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat Neurosci*, **3**, 1291-1300.
- Bellingham, S.A., Coleman, B.M. and Hill, A.F. (2012) Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res*, **40**(21):10937-49
- Bellingham, S.A., Guo, B.B., Coleman, B.M. and Hill, A.F. (2012) Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front Physiol*, **3**, 124.
- Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Bouron, A., Sadoul, R. and Goldberg, Y. (2010) CHMP2B mutants linked to frontotemporal dementia impair maturation of dendritic spines. *J Cell Sci*, **123**, 2943-2954.
- Belting, M. and Wittrup, A. (2008) Nanotubes, exosomes, and nucleic acid-binding peptides provide novel mechanisms of intercellular communication in eukaryotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol*, **183**, 1187-1191.
- Bertolino, M. and Llinas, R.R. (1992) The central role of voltage-activated and receptor-operated calcium channels in neuronal cells. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **32**, 399-421.
- Bilodeau, P.S., Urbanowski, J.L., Winistorfer, S.C. and Piper, R.C. (2002) The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat Cell Biol*, **4**, 534-539.
- Blanchard, N., Lankar, D., Faure, F., Regnault, A., Dumont, C., Raposo, G. and Hivroz, C. (2002) TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol*, **168**, 3235-3241.
- Blanpied, T.A., Scott, D.B. and Ehlers, M.D. (2002) Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. *Neuron*, **36**, 435-449.
- Bobrie, A., Krumeich, S., Rey, F., Recchi, C., Moita, L.F., Seabra, M.C., Ostrowski, M. and Thery, C. (2012) Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer Res*, **72**(19):4920-30
- Bohnert, S. and Schiavo, G. (2005) Tetanus toxin is transported in a novel neuronal compartment characterized by a specialized pH regulation. *J Biol Chem*, **280**, 42336-42344.
- Boissonneault, V., Plante, I., Rivest, S. and Provost, P. (2009) MicroRNA-298 and microRNA-328 regulate expression of mouse beta-amyloid precursor protein-converting enzyme 1. *J Biol Chem*, **284**, 1971-1981.

- Boquet, P. and Duflot, E. (1982) Tetanus toxin fragment forms channels in lipid vesicles at low pH. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 7614-7618.
- Bordet, T., Castelnau-Ptakhine, L., Fauchereau, F., Friocourt, G., Kahn, A. and Haase, G. (2001) Neuronal targeting of cardiotrophin-1 by coupling with tetanus toxin C fragment. *Mol Cell Neurosci*, **17**, 842-854.
- Bordji, K., Becerril-Ortega, J., Nicole, O. and Buisson, A. (2010) Activation of extrasynaptic, but not synaptic, NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid-ss production. *J Neurosci*, **30**, 15927-15942.
- Bowen, S., Ateh, D.D., Deinhardt, K., Bird, M.M., Price, K.M., Baker, C.S., Robson, J.C., Swash, M., Shamsuddin, W., Kavar, S., El-Tawil, T., Roos, J., Hoyle, A., Nickols, C.D., Knowles, C.H., Pullen, A.H., Luthert, P.J., Weller, R.O., Hafezparast, M., Franklin, R.J., Revesz, T., King, R.H., Berninghausen, O., Fisher, E.M., Schiavo, G. and Martin, J.E. (2007) The phagocytic capacity of neurones. *Eur J Neurosci*, **25**, 2947-2955.
- Brown, B.D., Gentner, B., Cantore, A., Colleoni, S., Amendola, M., Zingale, A., Baccarini, A., Lazzari, G., Galli, C. and Naldini, L. (2007a) Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. *Nat Biotechnol*, **25**, 1457-1467.
- Brown, T.C., Correia, S.S., Petrok, C.N. and Esteban, J.A. (2007b) Functional compartmentalization of endosomal trafficking for the synaptic delivery of AMPA receptors during long-term potentiation. *J Neurosci*, **27**, 13311-13315.
- Buschow, S.I., Nolte-'t Hoen, E.N., van Niel, G., Pols, M.S., ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, C.J., Raposo, G., Wubbolts, R., Wauben, M.H. and Stoorvogel, W. (2009) MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic*, **10**, 1528-1542.
- Caby, M.P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G. and Bonnerot, C. (2005) Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*, **17**, 879-887.
- Caleo, M. and Schiavo, G. (2009) Central effects of tetanus and botulinum neurotoxins. *Toxicon*, **54**, 593-599.
- Chadda, R., Howes, M.T., Plowman, S.J., Hancock, J.F., Parton, R.G. and Mayor, S. (2007) Cholesterol-sensitive Cdc42 activation regulates actin polymerization for endocytosis via the GEEC pathway. *Traffic*, **8**, 702-717.
- Charvin, N., L'Eveque, C., Walker, D., Berton, F., Raymond, C., Kataoka, M., Shoji-Kasai, Y., Takahashi, M., De Waard, M. and Seagar, M.J. (1997) Direct interaction of the calcium sensor protein synaptotagmin I with a cytoplasmic domain of the $\alpha 1A$ subunit of the P/Q-type calcium channel. *Embo J*, **16**, 4591-4596.
- Chaumont, S., Compan, V., Toulme, E., Richler, E., Housley, G.D., Rassendren, F. and Khakh, B.S. (2008) Regulation of P2X2 receptors by the neuronal calcium sensor VILIP1. *Sci Signal*, **1**, ra8.
- Chevallier, J., Chamoun, Z., Jiang, G., Prestwich, G., Sakai, N., Matile, S., Parton, R.G. and Gruenberg, J. (2008) Lysobisphosphatidic acid controls endosomal cholesterol levels. *J Biol Chem*, **283**, 27871-27880.
- Chiba, M., Kimura, M. and Asari, S. (2012) Exosomes secreted from human colorectal cancer cell lines contain mRNAs, microRNAs and natural antisense RNAs, that can transfer into the human hepatoma HepG2 and lung cancer A549 cell lines. *Oncol Rep*, **28**, 1551-1558.
- Chivet, M., Hemming, F., Pernet-Gallay, K., Fraboulet, S. and Sadoul, R. (2012) Emerging role of neuronal exosomes in the central nervous system. *Front Physiol*, **3**, 145.
- Clayton, A., Mitchell, J.P., Court, J., Mason, M.D. and Tabi, Z. (2007) Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res*, **67**, 7458-7466.
- Clayton, A., Turkes, A., Dewitt, S., Steadman, R., Mason, M.D. and Hallett, M.B. (2004) Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *Faseb J*, **18**, 977-979.
- Coen, L., Osta, R., Maury, M. and Brulet, P. (1997) Construction of hybrid proteins that migrate retrogradely and transynaptically into the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9400-9405.

- Cooney, J.R., Hurlburt, J.L., Selig, D.K., Harris, K.M. and Fiala, J.C. (2002) Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. *J Neurosci*, **22**, 2215-2224.
- Davis, A.F., Bai, J., Fasshauer, D., Wolowick, M.J., Lewis, J.L. and Chapman, E.R. (1999) Kinetics of synaptotagmin responses to Ca²⁺ and assembly with the core SNARE complex onto membranes. *Neuron*, **24**, 363-376.
- de Gassart, A., Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G. and Vidal, M. (2003) Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood*, **102**, 4336-4344.
- Deinhardt, K., Berninghausen, O., Willison, H.J., Hopkins, C.R. and Schiavo, G. (2006a) Tetanus toxin is internalized by a sequential clathrin-dependent mechanism initiated within lipid microdomains and independent of epsin1. *J Cell Biol*, **174**, 459-471.
- Deinhardt, K., Salinas, S., Verastegui, C., Watson, R., Worth, D., Hanrahan, S., Bucci, C. and Schiavo, G. (2006b) Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron*, **52**, 293-305.
- Delaguillaumie, A., Harriague, J., Kohanna, S., Bismuth, G., Rubinstein, E., Seigneuret, M. and Conjeaud, H. (2004) Tetraspanin CD82 controls the association of cholesterol-dependent microdomains with the actin cytoskeleton in T lymphocytes: relevance to co-stimulation. *J Cell Sci*, **117**, 5269-5282.
- Denzer, K., van Eijk, M., Kleijmeer, M.J., Jakobson, E., de Groot, C. and Geuze, H.J. (2000) Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol*, **165**, 1259-1265.
- Doherty, G.J. and McMahon, H.T. (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*, **78**, 857-902.
- Doyle, E.L., Ridger, V., Ferraro, F., Turmaine, M., Saftig, P. and Cutler, D.F. (2011) CD63 is an essential cofactor to leukocyte recruitment by endothelial P-selectin. *Blood*, **118**, 4265-4273.
- Edbauer, D., Neilson, J.R., Foster, K.A., Wang, C.F., Seeburg, D.P., Batterton, M.N., Tada, T., Dolan, B.M., Sharp, P.A. and Sheng, M. (2010) Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron*, **65**, 373-384.
- Ehlers, M.D. (2000) Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron*, **28**, 511-525.
- El-Husseini, A.E., Schnell, E., Chetkovich, D.M., Nicoll, R.A. and Brecht, D.S. (2000) PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science*, **290**, 1364-1368.
- Eldh, M., Lotvall, J., Malmhall, C. and Ekstrom, K. (2012) Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: evaluation of different methods. *Mol Immunol*, **50**, 278-286.
- Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S.D., Ntzouni, M., Margaritis, L.H., Stefanis, L. and Vekrellis, K. (2010) Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J Neurosci*, **30**, 6838-6851.
- Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O. and Geuze, H.J. (1998) Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem*, **273**, 20121-20127.
- Escudier, B., Dorval, T., Chaput, N., Andre, F., Caby, M.P., Novault, S., Flament, C., Leboulaire, C., Borg, C., Amigorena, S., Boccaccio, C., Bonnerot, C., Dhellin, O., Movassagh, M., Piperno, S., Robert, C., Serra, V., Valente, N., Le Pecq, J.B., Spatz, A., Lantz, O., Tursz, T., Angevin, E. and Zitvogel, L. (2005) Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med*, **3**, 10.
- Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R., Lovat, F., Fadda, P., Mao, C., Nuovo, G.J., Zanesi, N., Crawford, M., Ozer, G.H., Wernicke, D., Alder, H., Caligiuri, M.A., Nana-Sinkam, P., Perrotti, D. and Croce, C.M. (2012) MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, E2110-2116.
- Fader, C.M., Sanchez, D.G., Mestre, M.B. and Colombo, M.I. (2009) TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim Biophys Acta*. **1793**(12):1901-16

- Falguieres, T., Luyet, P.P., Bissig, C., Scott, C.C., Velluz, M.C. and Gruenberg, J. (2008) In vitro budding of intraluminal vesicles into late endosomes is regulated by Alix and Tsg101. *Mol Biol Cell*, **19**, 4942-4955.
- Falguieres, T., Luyet, P.P. and Gruenberg, J. (2009) Molecular assemblies and membrane domains in multivesicular endosome dynamics. *Exp Cell Res*, **315**, 1567-1573.
- Fang, Y., Wu, N., Gan, X., Yan, W., Morrell, J.C. and Gould, S.J. (2007) Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes. *PLoS Biol*, **5**, e158.
- Faure, J., Lachenal, G., Court, M., Hirrlinger, J., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Grange, J., Schoehn, G., Goldberg, Y., Boyer, V., Kirchhoff, F., Raposo, G., Garin, J. and Sadoul, R. (2006) Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci*, Vol. **31**, pp. 642-648.
- Feng, D., Zhao, W.L., Ye, Y.Y., Bai, X.C., Liu, R.Q., Chang, L.F., Zhou, Q. and Sui, S.F. (2010) Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*, **11**(5):675-87
- Fernandez-Chacon, R., Konigstorfer, A., Gerber, S.H., Garcia, J., Matos, M.F., Stevens, C.F., Brose, N., Rizo, J., Rosenmund, C. and Sudhof, T.C. (2001) Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature*, **410**, 41-49.
- Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H. and Raposo, G. (2004) Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9683-9688.
- Flannery, A.R., Czibener, C. and Andrews, N.W. (2010) Palmitoylation-dependent association with CD63 targets the Ca²⁺ sensor synaptotagmin VII to lysosomes. *J Cell Biol*, **191**, 599-613.
- Francesconi, A., Kumari, R. and Zukin, R.S. (2009) Regulation of group I metabotropic glutamate receptor trafficking and signaling by the caveolar/lipid raft pathway. *J Neurosci*, **29**, 3590-3602.
- Francis, J.W., Bastia, E., Matthews, C.C., Parks, D.A., Schwarzschild, M.A., Brown, R.H., Jr. and Fishman, P.S. (2004) Tetanus toxin fragment C as a vector to enhance delivery of proteins to the CNS. *Brain Res*, **1011**, 7-13.
- Fruhbeis, C., Frohlich, D. and Kramer-Albers, E.M. (2012) Emerging roles of exosomes in neuron-glia communication. *Front Physiol*, **3**, 119.
- Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I. and Illei, G.G. (2012) The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One*, **7**, e30679.
- Gao, Z., Reavey-Cantwell, J., Young, R.A., Jegier, P. and Wolf, B.A. (2000) Synaptotagmin III/VII isoforms mediate Ca²⁺-induced insulin secretion in pancreatic islet beta -cells. *J Biol Chem*, **275**, 36079-36085.
- Gastpar, R., Gehrmann, M., Bausero, M.A., Asea, A., Gross, C., Schroeder, J.A. and Multhoff, G. (2005) Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res*, **65**, 5238-5247.
- Gatti, J.L., Metayer, S., Belghazi, M., Dacheux, F. and Dacheux, J.L. (2005) Identification, proteomic profiling, and origin of ram epididymal fluid exosome-like vesicles. *Biol Reprod*, **72**, 1452-1465.
- Geminard, C., De Gassart, A., Blanc, L. and Vidal, M. (2004) Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TFR for sorting into exosomes. *Traffic*, **5**, 181-193.
- Geuze, H.J., Slot, J.W. and Schwartz, A.L. (1987) Membranes of sorting organelles display lateral heterogeneity in receptor distribution. *J Cell Biol*, **104**, 1715-1723.
- Gibbings, D., Leblanc, P., Jay, F., Pontier, D., Michel, F., Schwab, Y., Alais, S., Lagrange, T. and Voinnet, O. (2012) Human prion protein binds Argonaute and promotes accumulation of microRNA effector complexes. *Nat Struct Mol Biol*, **19**(5):517-24
- Gibbings, D.J., Ciaudo, C., Erhardt, M. and Voinnet, O. (2009) Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol*, **11**(9):1143-9
- Giraldez, A.J., Cinalli, R.M., Glasner, M.E., Enright, A.J., Thomson, J.M., Baskerville, S., Hammond, S.M., Bartel, D.P. and Schier, A.F. (2005) MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science*, **308**, 833-838.

- Gousset, K., Schiff, E., Langevin, C., Marijanovic, Z., Caputo, A., Browman, D.T., Chenouard, N., de Chaumont, F., Martino, A., Enninga, J., Olivo-Marin, J.C., Mannel, D. and Zurzolo, C. (2009) Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat Cell Biol*, **11**, 328-336.
- Graner, M.W., Alzate, O., Dechkovskaia, A.M., Keene, J.D., Sampson, J.H., Mitchell, D.A. and Bigner, D.D. (2009) Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *Faseb J*, **23**, 1541-1557.
- Gross, J.C., Chaudhary, V., Bartscherer, K. and Boutros, M. (2012) Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol*, **14**, 1036-1045.
- Gruenberg, J., Griffiths, G. and Howell, K.E. (1989) Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J Cell Biol*, **108**, 1301-1316.
- Gruenberg, J. and Stenmark, H. (2004) The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 317-323.
- Han, K. and Kim, E. (2008) Synaptic adhesion molecules and PSD-95. *Prog Neurobiol*, **84**, 263-283.
- Hanley, J.G. and Henley, J.M. (2005) PICK1 is a calcium-sensor for NMDA-induced AMPA receptor trafficking. *Embo J*, **24**, 3266-3278.
- Harding, C., Heuser, J. and Stahl, P. (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol*, **97**, 329-339.
- Havik, B., Rokke, H., Bardsen, K., Davanger, S. and Bramham, C.R. (2003) Bursts of high-frequency stimulation trigger rapid delivery of pre-existing alpha-CaMKII mRNA to synapses: a mechanism in dendritic protein synthesis during long-term potentiation in adult awake rats. *Eur J Neurosci*, **17**, 2679-2689.
- Heijnen, H.F., Schiel, A.E., Fijnheer, R., Geuze, H.J. and Sixma, J.J. (1999) Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*, **94**, 3791-3799.
- Heine, M., Groc, L., Frischknecht, R., Beique, J.C., Lounis, B., Rumbaugh, G., Huguier, R.L., Cognet, L. and Choquet, D. (2008) Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science*, **320**, 201-205.
- Hering, H., Lin, C.C. and Sheng, M. (2003) Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci*, **23**, 3262-3271.
- Herreros, J., Ng, T. and Schiavo, G. (2001) Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol Biol Cell*, **12**, 2947-2960.
- Hirling, H. (2009) Endosomal trafficking of AMPA-type glutamate receptors. *Neuroscience*, **158**, 36-44.
- Hoffman, E.A., Perkumas, K.M., Highstrom, L.M. and Stamer, W.D. (2009) Regulation of myocilin-associated exosome release from human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **50**, 1313-1318.
- Holopainen, J.M., Subramanian, M. and Kinnunen, P.K. (1998) Sphingomyelinase induces lipid microdomain formation in a fluid phosphatidylcholine/sphingomyelin membrane. *Biochemistry*, **37**, 17562-17570.
- Hong, B.S., Cho, J.H., Kim, H., Choi, E.J., Rho, S., Kim, J., Kim, J.H., Choi, D.S., Kim, Y.K., Hwang, D. and Gho, Y.S. (2009) Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC Genomics*, **10**, 556.
- Howes, M.T., Mayor, S. and Parton, R.G. (2010) Molecules, mechanisms, and cellular roles of clathrin-independent endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*, **22**, 519-527.
- Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S., Manrique-Hoyos, N., Jung, S., Lauterbach, M.A., Bakhti, M., Gronborg, M., Mobius, W., Rhee, J., Barr, F.A. and Simons, M. (2010) Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J Cell Biol*, **189**, 223-232.
- Hundorfean, G., Zimmer, K.P., Strobel, S., Gebert, A., Ludwig, D. and Buning, J. (2007) Luminal antigens access late endosomes of intestinal epithelial cells enriched in MHC I and MHC II molecules: in vivo study in Crohn's ileitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **293**, G798-808.

- Hurley, J.H. and Hanson, P.I. (2010) Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **11**, 556-566.
- Im, H.I. and Kenny, P.J. (2012) MicroRNAs in neuronal function and dysfunction. *Trends Neurosci*, **35**, 325-334.
- Irion, U. and St Johnston, D. (2007) bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex. *Nature*, **445**, 554-558.
- Jahn, R. and Fasshauer, D. (2012) Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*, **490**, 201-207.
- Johnstone, R.M. (2005) Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells Mol Dis*, **34**, 214-219.
- Johnstone, R.M. (2006) Exosomes biological significance: A concise review. *Blood Cells Mol Dis*, **36**, 315-321.
- Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L. and Turbide, C. (1987) Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*, **262**, 9412-9420.
- Kaczmarek-Hajek, K., Lorinczi, E., Hausmann, R. and Nicke, A. (2012) Molecular and functional properties of P2X receptors--recent progress and persisting challenges. *Purinergic Signal*, **8**, 375-417.
- Kapsogeorgou, E.K., Abu-Helu, R.F., Moutsopoulos, H.M. and Manoussakis, M.N. (2005) Salivary gland epithelial cell exosomes: A source of autoantigenic ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum*, **52**, 1517-1521.
- Katzmann, D.J., Babst, M. and Emr, S.D. (2001) Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*, **106**, 145-155.
- Katzmann, D.J., Stefan, C.J., Babst, M. and Emr, S.D. (2003) Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol*, **162**, 413-423.
- Kennedy, M.J. and Ehlers, M.D. (2006) Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, **29**, 325-362.
- Kim, A.H., Parker, E.K., Williamson, V., McMichael, G.O., Fanous, A.H. and Vladimirov, V.I. (2012) Experimental validation of candidate schizophrenia gene ZNF804A as target for hsa-miR-137. *Schizophr Res*, **141**, 60-64.
- Kim, A.H., Reimers, M., Maher, B., Williamson, V., McMichael, O., McClay, J.L., van den Oord, E.J., Riley, B.P., Kendler, K.S. and Vladimirov, V.I. (2010) MicroRNA expression profiling in the prefrontal cortex of individuals affected with schizophrenia and bipolar disorders. *Schizophr Res*, **124**, 183-191.
- Kissa, K., Mordélet, E., Soudais, C., Kremer, E.J., Demeneix, B.A., Brulet, P. and Coen, L. (2002) In vivo neuronal tracing with GFP-TTC gene delivery. *Mol Cell Neurosci*, **20**, 627-637.
- Kitamura, M., Takamiya, K., Aizawa, S., Furukawa, K. and Furukawa, K. (1999) Gangliosides are the binding substances in neural cells for tetanus and botulinum toxins in mice. *Biochim Biophys Acta*, **1441**, 1-3.
- Kobayashi, T., Beuchat, M.H., Chevallier, J., Makino, A., Mayran, N., Escola, J.M., Lebrand, C., Cosson, P., Kobayashi, T. and Gruenberg, J. (2002) Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *J Biol Chem*, **277**, 32157-32164.
- Kogure, T., Lin, W.L., Yan, I.K., Braconi, C. and Patel, T. (2011) Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology*, **54**, 1237-1248.
- Koles, K., Nunnari, J., Korkut, C., Barria, R., Brewer, C., Li, Y., Leszyk, J., Zhang, B. and Budnik, V. (2012) Mechanism of evenness interrupted (evi)-exosome release at synaptic boutons. *J Biol Chem*, **287**, 16820-16834.
- Korkut, C., Ataman, B., Ramachandran, P., Ashley, J., Barria, R., Gherbesi, N. and Budnik, V. (2009) Trans-synaptic transmission of vesicular Wnt signals through Evi/Wntless. *Cell*, **139**, 393-404.

- Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y. and Ochiya, T. (2010) Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*, **285**, 17442-17452.
- Kramer-Albers, E.M., Bretz, N., Tenzer, S., Winterstein, C., Mobius, W., Berger, H., Nave, K.A., Schild, H. and Trotter, J. (2007) Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics Clin Appl*, **1**, 1446-1461.
- Kumari, S. and Mayor, S. (2008) ARF1 is directly involved in dynamin-independent endocytosis. *Nat Cell Biol*, **10**, 30-41.
- Lachenal, G., Pernet-Gallay, K., Chivet, M., Hemming, F.J., Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Haase, G., Goldberg, Y. and Sadoul, R. (2011) Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol Cell Neurosci*. **46**(2):409-18
- Lakkaraju, A. and Rodriguez-Boulan, E. (2008) Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol*, **18**, 199-209.
- Lalli, G., Bohnert, S., Deinhardt, K., Verastegui, C. and Schiavo, G. (2003) The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. *Trends Microbiol*, **11**, 431-437.
- Lalli, G. and Schiavo, G. (2002) Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75NTR. *J Cell Biol*, **156**, 233-239.
- Laulagnier, K., Grand, D., Dujardin, A., Hamdi, S., Vincent-Schneider, H., Lankar, D., Salles, J.P., Bonnerot, C., Perret, B. and Record, M. (2004a) PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes. *FEBS Lett*, **572**, 11-14.
- Laulagnier, K., Motta, C., Hamdi, S., Roy, S., Fauvelle, F., Pageaux, J.F., Kobayashi, T., Salles, J.P., Perret, B., Bonnerot, C. and Record, M. (2004b) Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem J*, **380**, 161-171.
- Laulagnier, K., Vincent-Schneider, H., Hamdi, S., Subra, C., Lankar, D. and Record, M. (2005) Characterization of exosome subpopulations from RBL-2H3 cells using fluorescent lipids. *Blood Cells Mol Dis*, **35**, 116-121.
- Le Blanc, I., Luyet, P.P., Pons, V., Ferguson, C., Emans, N., Petiot, A., Mayran, N., Demareux, N., Faure, J., Sadoul, R., Parton, R.G. and Gruenberg, J. (2005) Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat Cell Biol*, **7**, 653-664.
- Lebrand, C., Corti, M., Goodson, H., Cosson, P., Cavalli, V., Mayran, N., Faure, J. and Gruenberg, J. (2002) Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7. *Embo J*, **21**, 1289-1300.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75**, 843-854.
- Lee, S.H., Simonetta, A. and Sheng, M. (2004) Subunit rules governing the sorting of internalized AMPA receptors in hippocampal neurons. *Neuron*, **43**, 221-236.
- Lee, S.T., Chu, K., Im, W.S., Yoon, H.J., Im, J.Y., Park, J.E., Park, K.H., Jung, K.H., Lee, S.K., Kim, M. and Roh, J.K. (2011) Altered microRNA regulation in Huntington's disease models. *Exp Neurol*, **227**, 172-179.
- Lee, Y.S., Pressman, S., Andress, A.P., Kim, K., White, J.L., Cassidy, J.J., Li, X., Lubell, K., Lim, D.H., Cho, I.S., Nakahara, K., Preall, J.B., Bellare, P., Sontheimer, E.J. and Carthew, R.W. (2009) Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. *Nat Cell Biol*. **11**(9):1150-6
- Lespagnol, A., Duflaut, D., Beekman, C., Blanc, L., Fiucci, G., Marine, J.C., Vidal, M., Amson, R. and Telerman, A. (2008) Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice. *Cell Death Differ*, **15**, 1723-1733.
- Leveque, C., Hoshino, T., David, P., Shoji-Kasai, Y., Leys, K., Omori, A., Lang, B., el Far, O., Sato, K., Martin-Moutot, N. and et al. (1992) The synaptic vesicle protein synaptotagmin associates with calcium channels and is a putative Lambert-Eaton myasthenic syndrome antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 3625-3629.

- Levy, S. and Shoham, T. (2005) Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology (Bethesda)*, **20**, 218-224.
- Li, D., Ropert, N., Koulakoff, A., Giaume, C. and Oheim, M. (2008) Lysosomes are the major vesicular compartment undergoing Ca^{2+} -regulated exocytosis from cortical astrocytes. *J Neurosci*, **28**, 7648-7658.
- Ling, K.H., Brautigan, P.J., Hahn, C.N., Daish, T., Rayner, J.R., Cheah, P.S., Raison, J.M., Piltz, S., Mann, J.R., Mattiske, D.M., Thomas, P.Q., Adelson, D.L. and Scott, H.S. (2011) Deep sequencing analysis of the developing mouse brain reveals a novel microRNA. *BMC Genomics*, **12**, 176.
- Liu, C., Yu, S., Zinn, K., Wang, J., Zhang, L., Jia, Y., Kappes, J.C., Barnes, S., Kimberly, R.P., Grizzle, W.E. and Zhang, H.G. (2006) Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J Immunol*, **176**, 1375-1385.
- Liu, W.F., Zuo, H.J., Chai, B.L., Peng, D., Fei, Y.J., Lin, J.Y., Yu, X.H., Wang, D.W. and Liu, Z.X. (2011) Role of tetraspanin CD151- α 3/ α 6 integrin complex: Implication in angiogenesis CD151-integrin complex in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, **43**, 642-650.
- Llorente, A., van Deurs, B. and Sandvig, K. (2007) Cholesterol regulates prostatesome release from secretory lysosomes in PC-3 human prostate cancer cells. *Eur J Cell Biol*, **86**, 405-415.
- Lorenzon, N.M. and Foehring, R.C. (1995a) Characterization of pharmacologically identified voltage-gated calcium channel currents in acutely isolated rat neocortical neurons. I. Adult neurons. *J Neurophysiol*, **73**, 1430-1442.
- Lorenzon, N.M. and Foehring, R.C. (1995b) Characterization of pharmacologically identified voltage-gated calcium channel currents in acutely isolated rat neocortical neurons. II. Postnatal development. *J Neurophysiol*, **73**, 1443-1451.
- Lugini, L., Cecchetti, S., Huber, V., Luciani, F., Macchia, G., Spadaro, F., Paris, L., Abalsamo, L., Colone, M., Molinari, A., Podo, F., Rivoltini, L., Ramoni, C. and Fais, S. (2012) Immune surveillance properties of human NK cell-derived exosomes. *J Immunol*, **189**, 2833-2842.
- Lundmark, R., Doherty, G.J., Howes, M.T., Cortese, K., Vallis, Y., Parton, R.G. and McMahon, H.T. (2008) The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway. *Curr Biol*, **18**, 1802-1808.
- Luyet, P.P., Falguieres, T., Pons, V., Pattnaik, A.K. and Gruenberg, J. (2008) The ESCRT-I subunit TSG101 controls endosome-to-cytosol release of viral RNA. *Traffic*, **9**, 2279-2290.
- Mahul-Mellier, A.L., Hemming, F.J., Blot, B., Fraboulet, S. and Sadoul, R. (2006) Alix, making a link between apoptosis-linked gene-2, the endosomal sorting complexes required for transport, and neuronal death in vivo. *J Neurosci*, **26**, 542-549.
- Mallegol, J., Van Niel, G., Lebreton, C., Lepelletier, Y., Candalh, C., Dugave, C., Heath, J.K., Raposo, G., Cerf-Bensussan, N. and Heyman, M. (2007) T84-intestinal epithelial exosomes bear MHC class II/peptide complexes potentiating antigen presentation by dendritic cells. *Gastroenterology*, **132**, 1866-1876.
- Martinez, I., Chakrabarti, S., Hellevik, T., Morehead, J., Fowler, K. and Andrews, N.W. (2000) Synaptotagmin VII regulates Ca^{2+} -dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts. *J Cell Biol*, **148**, 1141-1149.
- Maskos, U., Kissa, K., St Clément, C. and Brulet, P. (2002) Retrograde trans-synaptic transfer of green fluorescent protein allows the genetic mapping of neuronal circuits in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 10120-10125.
- Mathivanan, S., Fahner, C.J., Reid, G.E. and Simpson, R.J. (2012) ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res*, **40**, D1241-1244.
- Mathivanan, S., Lim, J.W., Tauro, B.J., Ji, H., Moritz, R.L. and Simpson, R.J. (2009) Proteomic analysis of A33-immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Mol Cell Proteomics*, **9**(2):197-208
- Matsuo, H., Chevallier, J., Mayran, N., Le Blanc, I., Ferguson, C., Faure, J., Blanc, N.S., Matile, S., Dubochet, J., Sadoul, R., Parton, R.G., Vilbois, F. and Gruenberg, J. (2004) Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science*, **303**, 531-534.

- Matteoli, M., Verderio, C., Rossetto, O., Iezzi, N., Coco, S., Schiavo, G. and Montecucco, C. (1996) Synaptic vesicle endocytosis mediates the entry of tetanus neurotoxin into hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13310-13315.
- Mayor, S. and Pagano, R.E. (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 603-612.
- Mellios, N., Sugihara, H., Castro, J., Banerjee, A., Le, C., Kumar, A., Crawford, B., Strathmann, J., Tropea, D., Levine, S.S., Edbauer, D. and Sur, M. (2011) miR-132, an experience-dependent microRNA, is essential for visual cortex plasticity. *Nat Neurosci*, **14**, 1240-1242.
- Michael, A., Bajracharya, S.D., Yuen, P.S., Zhou, H., Star, R.A., Illei, G.G. and Alevizos, I. (2009) Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis*, **16**(1):34-8
- Miller, B.H., Zeier, Z., Xi, L., Lanz, T.A., Deng, S., Strathmann, J., Willoughby, D., Kenny, P.J., Elsworth, J.D., Lawrence, M.S., Roth, R.H., Edbauer, D., Kleiman, R.J. and Wahlestedt, C. (2012) MicroRNA-132 dysregulation in schizophrenia has implications for both neurodevelopment and adult brain function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 3125-3130.
- Misra, S. and Hurley, J.H. (1999) Crystal structure of a phosphatidylinositol 3-phosphate-specific membrane-targeting motif, the FYVE domain of Vps27p. *Cell*, **97**, 657-666.
- Missotten, M., Nichols, A., Rieger, K. and Sadoul, R. (1999) Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein. *Cell Death Differ*, **6**, 124-129.
- Mittelbrunn, M., Gutierrez-Vazquez, C., Villarroya-Beltri, C., Gonzalez, S., Sanchez-Cabo, F., Gonzalez, M.A., Bernad, A. and Sanchez-Madrid, F. (2011) Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*, **2**, 282.
- Mittelbrunn, M. and Sanchez-Madrid, F. (2012) Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **13**, 328-335.
- Mobius, W., Ohno-Iwashita, Y., van Donselaar, E.G., Oorschot, V.M., Shimada, Y., Fujimoto, T., Heijnen, H.F., Geuze, H.J. and Slot, J.W. (2002) Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O. *J Histochem Cytochem*, **50**, 43-55.
- Mobius, W., van Donselaar, E., Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Heijnen, H.F., Slot, J.W. and Geuze, H.J. (2003) Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic*, **4**, 222-231.
- Montecalvo, A., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Beer Stolz, D., Sullivan, M.L., Karlsson, J.M., Baty, C.J., Gibson, G.A., Erdos, G., Wang, Z., Milosevic, J., Tkacheva, O.A., Divito, S.J., Jordan, R., Lyons-Weiler, J., Watkins, S.C. and Morelli, A.E. (2012) Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*, **119**, 756-766.
- Montecalvo, A., Shufesky, W.J., Stolz, D.B., Sullivan, M.G., Wang, Z., Divito, S.J., Papworth, G.D., Watkins, S.C., Robbins, P.D., Larregina, A.T. and Morelli, A.E. (2008) Exosomes as a short-range mechanism to spread alloantigen between dendritic cells during T cell allorecognition. *J Immunol*, **180**, 3081-3090.
- Montecucco, C., Rossetto, O. and Schiavo, G. (2004) Presynaptic receptor arrays for clostridial neurotoxins. *Trends Microbiol*, **12**, 442-446.
- Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Sullivan, M.L., Stolz, D.B., Papworth, G.D., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Wang, Z., Watkins, S.C., Falo, L.D., Jr. and Thomson, A.W. (2004) Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*, **104**, 3257-3266.
- Morse, M.A., Garst, J., Osada, T., Khan, S., Hobeika, A., Clay, T.M., Valente, N., Shreeniwas, R., Sutton, M.A., Delcayre, A., Hsu, D.H., Le Pecq, J.B. and Lyster, H.K. (2005) A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Transl Med*, **3**, 9.
- Mullock, B.M., Smith, C.W., Ihrke, G., Bright, N.A., Lindsay, M., Parkinson, E.J., Brooks, D.A., Parton, R.G., James, D.E., Luzio, J.P. and Piper, R.C. (2000) Syntaxin 7 is localized to late endosome compartments, associates with Vamp 8, and is required for late endosome-lysosome fusion. *Mol Biol Cell*, **11**, 3137-3153.

- Munro, P., Kojima, H., Dupont, J.L., Bossu, J.L., Poulain, B. and Boquet, P. (2001) High sensitivity of mouse neuronal cells to tetanus toxin requires a GPI-anchored protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **289**, 623-629.
- Nabhan, J.F., Hu, R., Oh, R.S., Cohen, S.N. and Lu, Q. (2012) Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 4146-4151.
- Nickerson, D.P., Brett, C.L. and Merz, A.J. (2009) Vps-C complexes: gatekeepers of endolysosomal traffic. *Curr Opin Cell Biol*, **21**, 543-551.
- Nickerson, D.P., West, M. and Odorizzi, G. (2006) Did2 coordinates Vps4-mediated dissociation of ESCRT-III from endosomes. *J Cell Biol*, **175**, 715-720.
- Niemann, H., Blasi, J. and Jahn, R. (1994) Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis. *Trends Cell Biol*, **4**, 179-185.
- Nixon, R.A. (2005) Endosome function and dysfunction in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*, **26**, 373-382.
- Nolte-'t Hoen, E.N., Buermans, H.P., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M.H. and 't Hoen, P.A. (2012) Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res*, **40**, 9272-9285.
- Nonnenmacher, M. and Weber, T. (2011) Adeno-associated virus 2 infection requires endocytosis through the CLIC/GEEC pathway. *Cell Host Microbe*, **10**, 563-576.
- Nurminen, T.A., Holopainen, J.M., Zhao, H. and Kinnunen, P.K. (2002) Observation of topical catalysis by sphingomyelinase coupled to microspheres. *J Am Chem Soc*, **124**, 12129-12134.
- Odorizzi, G. (2006) The multiple personalities of Alix. *J Cell Sci*, **119**, 3025-3032.
- Ogawa, Y., Kanai-Azuma, M., Akimoto, Y., Kawakami, H. and Yanoshita, R. (2008) Exosome-like vesicles with dipeptidyl peptidase IV in human saliva. *Biol Pharm Bull*, **31**, 1059-1062.
- Ohshima, K., Inoue, K., Fujiwara, A., Hatakeyama, K., Kanto, K., Watanabe, Y., Muramatsu, K., Fukuda, Y., Ogura, S., Yamaguchi, K. and Mochizuki, T. (2010) Let-7 MicroRNA Family Is Selectively Secreted into the Extracellular Environment via Exosomes in a Metastatic Gastric Cancer Cell Line. *PLoS One*, **5**(10):e13247
- Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., Goud, B., Benaroch, P., Hacohen, N., Fukuda, M., Desnos, C., Seabra, M.C., Darchen, F., Amigorena, S., Moita, L.F. and Thery, C. (2010) Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol*, **12**, 19-30; sup pp 11-13.
- Palanisamy, V., Sharma, S., Deshpande, A., Zhou, H., Gimzewski, J. and Wong, D.T. (2010) Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. *PLoS One*, **5**, e8577.
- Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M. and Johnstone, R.M. (1985) Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol*, **101**, 942-948.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Krishtal, O.A. and Verkhratsky, A. (2009) P2X receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience*, **158**, 137-148.
- Park, J.E., Tan, H.S., Datta, A., Lai, R.C., Zhang, H., Meng, W., Lim, S.K. and Sze, S.K. (2010) Hypoxia modulates tumor microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Mol Cell Proteomics*. **9**(6):1085-99
- Park, M., Salgado, J.M., Ostroff, L., Helton, T.D., Robinson, C.G., Harris, K.M. and Ehlers, M.D. (2006) Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron*, **52**, 817-830.
- Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., de Mito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M.A., Molinari, A., Colone, M., Tatti, M., Sargiacomo, M. and Fais, S. (2009) Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem*. **284**(49):34211-22

- Parton, R.G., Ockleford, C.D. and Critchley, D.R. (1987) A study of the mechanism of internalisation of tetanus toxin by primary mouse spinal cord cultures. *J Neurochem*, **49**, 1057-1068.
- Parton, R.G., Simons, K. and Dotti, C.G. (1992) Axonal and dendritic endocytic pathways in cultured neurons. *J Cell Biol*, **119**, 123-137.
- Passafaro, M., Piech, V. and Sheng, M. (2001) Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nat Neurosci*, **4**, 917-926.
- Pegtél, D.M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D.A., van Eijndhoven, M.A., Hopmans, E.S., Lindenberg, J.L., de Gruijl, T.D., Wurdinger, T. and Middeldorp, J.M. (2010) Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 6328-6333.
- Pieri, M., Caioli, S., Canu, N., Mercuri, N.B., Guatteo, E. and Zona, C. (2012) Over-expression of N-type calcium channels in cortical neurons from a mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Exp Neurol*. S0014-4886(12)00419-0
- Piper, R.C. and Katzmann, D.J. (2007) Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **23**, 519-547.
- Pisitkun, T., Shen, R.F. and Knepper, M.A. (2004) Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 13368-13373.
- Podolska, A., Kaczowski, B., Kamp Busk, P., Sokilde, R., Litman, T., Fredholm, M. and Cirera, S. (2011) MicroRNA expression profiling of the porcine developing brain. *PLoS One*, **6**, e14494.
- Pols, M.S. and Klumperman, J. (2009) Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res*, **315**, 1584-1592.
- Potolichio, I., Carven, G.J., Xu, X., Stipp, C., Riese, R.J., Stern, L.J. and Santambrogio, L. (2005) Proteomic analysis of microglia-derived exosomes: metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism. *J Immunol*, **175**, 2237-2243.
- Price, D.L., Griffin, J., Young, A., Peck, K. and Stocks, A. (1975) Tetanus toxin: direct evidence for retrograde intraaxonal transport. *Science*, **188**, 945-947.
- Qu, J.L., Qu, X.J., Zhao, M.F., Teng, Y.E., Zhang, Y., Hou, K.Z., Jiang, Y.H., Yang, X.H. and Liu, Y.P. (2009) Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation. *Dig Liver Dis*, **41**, 875-880.
- Qu, Y. and Dubyak, G.R. (2009) P2X7 receptors regulate multiple types of membrane trafficking responses and non-classical secretion pathways. *Purinergic Signal*, **5**, 163-173.
- Qu, Y., Franchi, L., Nunez, G. and Dubyak, G.R. (2007) Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol*, **179**, 1913-1925.
- Rabinowits, G., Gercel-Taylor, C., Day, J.M., Taylor, D.D. and Kloecker, G.H. (2009) Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer*, **10**, 42-46.
- Raiborg, C., Bache, K.G., Mehlum, A., Stang, E. and Stenmark, H. (2001a) Hrs recruits clathrin to early endosomes. *Embo J*, **20**, 5008-5021.
- Raiborg, C., Bremnes, B., Mehlum, A., Gillooly, D.J., D'Arrigo, A., Stang, E. and Stenmark, H. (2001b) FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J Cell Sci*, **114**, 2255-2263.
- Raiborg, C., Rusten, T.E. and Stenmark, H. (2003) Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 446-455.
- Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T.R., Keller, P., Geiger, K.D., Verkade, P. and Simons, K. (2006) Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 11172-11177.
- Rao, S.K., Huynh, C., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T. and Andrews, N.W. (2004) Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis. *J Biol Chem*, **279**, 20471-20479.
- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J. and Geuze, H.J. (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*, **183**, 1161-1172.

- Raposo, G., Tenza, D., Mecheri, S., Peronet, R., Bonnerot, C. and Desaymard, C. (1997) Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell*, **8**, 2631-2645.
- Rassendren, F., Buell, G.N., Virginio, C., Collo, G., North, R.A. and Surprenant, A. (1997) The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem*, **272**, 5482-5486.
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P. and Ratajczak, M.Z. (2006) Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, **20**, 847-856.
- Rathjen, F.G. and Schachner, M. (1984) Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *Embo J*, **3**, 1-10.
- Rauch, S. and Martin-Serrano, J. (2010) Multiple interactions between the ESCRT machinery and arrestin-related proteins: implications for PPXY-dependent budding. *J Virol*, **85**, 3546-3556.
- Raymond, C.K., Howald-Stevenson, I., Vater, C.A. and Stevens, T.H. (1992) Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell*, **3**, 1389-1402.
- Rieder, S.E., Banta, L.M., Kohrer, K., McCaffery, J.M. and Emr, S.D. (1996) Multilamellar endosome-like compartment accumulates in the yeast vps28 vacuolar protein sorting mutant. *Mol Biol Cell*, **7**, 985-999.
- Rind, H.B., Butowt, R. and von Bartheld, C.S. (2005) Synaptic targeting of retrogradely transported trophic factors in motoneurons: comparison of glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor, and cardiotrophin-1 with tetanus toxin. *J Neurosci*, **25**, 539-549.
- Rizo, J. and Sudhof, T.C. (2002) Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci*, **3**, 641-653.
- Roux, S., Colasante, C., Saint Clément, C., Barbier, J., Curie, T., Girard, E., Molgo, J. and Brulet, P. (2005) Internalization of a GFP-tetanus toxin C-terminal fragment fusion protein at mature mouse neuromuscular junctions. *Mol Cell Neurosci*, **30**, 572-582.
- Roux, S., Leotot, J., Chevallier, N., Bierling, P. and Rouard, H. (2011) [Mesenchymal stromal cells: Biological properties and clinical prospects]. *Transfus Clin Biol*, **18**, 1-12.
- Rummel, A., Bade, S., Alves, J., Bigalke, H. and Binz, T. (2003) Two carbohydrate binding sites in the H(CC)-domain of tetanus neurotoxin are required for toxicity. *J Mol Biol*, **326**, 835-847.
- Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R.G. and Mayor, S. (2002) GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev Cell*, **2**, 411-423.
- Sadoul, R. (2006) Do Alix and ALG-2 really control endosomes for better or for worse? *Biol Cell*, **98**, 69-77.
- Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A.E. and Emr, S.D. (2009) Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell*, **136**, 97-109.
- Salinas, S., Bilsland, L.G., Henaff, D., Weston, A.E., Keriell, A., Schiavo, G. and Kremer, E.J. (2009) CAR-associated vesicular transport of an adenovirus in motor neuron axons. *PLoS Pathog*, **5**, e1000442.
- Salinas, S., Schiavo, G. and Kremer, E.J. (2010) A hitchhiker's guide to the nervous system: the complex journey of viruses and toxins. *Nat Rev Microbiol*, **8**, 645-655.
- Saman, S., Kim, W., Raya, M., Visnick, Y., Miro, S., Saman, S., Jackson, B., McKee, A.C., Alvarez, V.E., Lee, N.C. and Hall, G.F. (2012) Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J Biol Chem*, **287**, 3842-3849.
- Sato, M., Sato, K., Liou, W., Pant, S., Harada, A. and Grant, B.D. (2008) Regulation of endocytic recycling by *C. elegans* Rab35 and its regulator RME-4, a coated-pit protein. *Embo J*, **27**, 1183-1196.

- Saunderson, S.C., Schuberth, P.C., Dunn, A.C., Miller, L., Hock, B.D., MacKay, P.A., Koch, N., Jack, R.W. and McLellan, A.D. (2008) Induction of exosome release in primary B cells stimulated via CD40 and the IL-4 receptor. *J Immunol*, **180**, 8146-8152.
- Savina, A., Fader, C.M., Damiani, M.T. and Colombo, M.I. (2005) Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic*, **6**, 131-143.
- Savina, A., Furlan, M., Vidal, M. and Colombo, M.I. (2003) Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem*, **278**, 20083-20090.
- Savina, A., Vidal, M. and Colombo, M.I. (2002) The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci*, **115**, 2505-2515.
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Laureto, P., DasGupta, B.R. and Montecucco, C. (1992a) Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*, **359**, 832-835.
- Schiavo, G., Poulain, B., Rossetto, O., Benfenati, F., Tauc, L. and Montecucco, C. (1992b) Tetanus toxin is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depend on zinc. *Embo J*, **11**, 3577-3583.
- Schratt, G. (2009) Fine-tuning neural gene expression with microRNAs. *Curr Opin Neurobiol*, **19**, 213-219.
- Schwab, M.E., Suda, K. and Thoenen, H. (1979) Selective retrograde transsynaptic transfer of a protein, tetanus toxin, subsequent to its retrograde axonal transport. *J Cell Biol*, **82**, 798-810.
- Segura, E., Guerin, C., Hogg, N., Amigorena, S. and Thery, C. (2007) CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *J Immunol*, **179**, 1489-1496.
- Selak, S., Paternain, A.V., Fritzler, M.J. and Lerma, J. (2006) Human autoantibodies against early endosome antigen-1 enhance excitatory synaptic transmission. *Neuroscience*, **143**, 953-964.
- Shapiro, R.E., Specht, C.D., Collins, B.E., Woods, A.S., Cotter, R.J. and Schnaar, R.L. (1997) Identification of a ganglioside recognition domain of tetanus toxin using a novel ganglioside photoaffinity ligand. *J Biol Chem*, **272**, 30380-30386.
- Sharples, R.A., Vella, L.J., Nisbet, R.M., Naylor, R., Perez, K., Barnham, K.J., Masters, C.L. and Hill, A.F. (2008) Inhibition of gamma-secretase causes increased secretion of amyloid precursor protein C-terminal fragments in association with exosomes. *FASEB J*, **22**, 1469-1478.
- Sheng, M. (2001) Molecular organization of the postsynaptic specialization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7058-7061.
- Sieczkarski, S.B. and Whittaker, G.R. (2002) Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol*, **83**, 1535-1545.
- Siegel, G., Obernosterer, G., Fiore, R., Oehmen, M., Bicker, S., Christensen, M., Khudayberdiev, S., Leuschner, P.F., Busch, C.J., Kane, C., Hubel, K., Dekker, F., Hedberg, C., Rengarajan, B., Drepper, C., Waldmann, H., Kauppinen, S., Greenberg, M.E., Draguhn, A., Rehmsmeier, M., Martinez, J. and Schratt, G.M. (2009) A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the depalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. *Nat Cell Biol*, **11**, 705-716.
- Simon, D., Garcia-Garcia, E., Gomez-Ramos, A., Falcon-Perez, J.M., Diaz-Hernandez, M., Hernandez, F. and Avila, J. (2012) Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *Neurodegener Dis*, **10**, 73-75.
- Simons, M. and Raposo, G. (2009) Exosomes - vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*, **21**(4):575-81
- Skog, J., Wurdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W.T., Jr., Carter, B.S., Krichevsky, A.M. and Breakefield, X.O. (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*, **10**, 1470-1476.
- Skokos, D., Botros, H.G., Demeure, C., Morin, J., Peronet, R., Birkenmeier, G., Boudaly, S. and Mecheri, S. (2003) Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. *J Immunol*, **170**, 3037-3045.

- Skokos, D., Le Panse, S., Villa, I., Rousselle, J.C., Peronet, R., David, B., Namane, A. and Mecheri, S. (2001) Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes. *J Immunol*, **166**, 868-876.
- Smrt, R.D., Szulwach, K.E., Pfeiffer, R.L., Li, X., Guo, W., Pathania, M., Teng, Z.Q., Luo, Y., Peng, J., Bordey, A., Jin, P. and Zhao, X. (2010) MicroRNA miR-137 Regulates Neuronal Maturation by Targeting Ubiquitin Ligase Mind Bomb-1. *Stem Cells*, **28**, 1060-1070.
- Stenmark, H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 513-525.
- Stoeck, A., Keller, S., Riedle, S., Sanderson, M.P., Runz, S., Le Naour, F., Gutwein, P., Ludwig, A., Rubinstein, E. and Altevogt, P. (2006) A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J*, **393**, 609-618.
- Stoorvogel, W., Strous, G.J., Geuze, H.J., Oorschot, V. and Schwartz, A.L. (1991) Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell*, **65**, 417-427.
- Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E. and Gottlinger, H.G. (2003) AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*, **114**, 689-699.
- Stuchell, M.D., Garrus, J.E., Muller, B., Stray, K.M., Ghaffarian, S., McKinnon, R., Krausslich, H.G., Morham, S.G. and Sundquist, W.I. (2004) The human endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) and its role in HIV-1 budding. *J Biol Chem*, **279**, 36059-36071.
- Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H. and Brech, A. (2009) Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*, **10**, 925-937.
- Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B. and Record, M. (2007) Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*, **89**, 205-212.
- Sudhof, T.C. (2012) Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**, a011353.
- Suzuki, T., Tian, Q.B., Kuromitsu, J., Kawai, T. and Endo, S. (2007) Characterization of mRNA species that are associated with postsynaptic density fraction by gene chip microarray analysis. *Neurosci Res*, **57**, 61-85.
- Swanger, S.A. and Bassell, G.J. (2011) Making and breaking synapses through local mRNA regulation. *Curr Opin Genet Dev*. **21**(4):414-21
- Takeda, Y., Kazarov, A.R., Butterfield, C.E., Hopkins, B.D., Benjamin, L.E., Kaipainen, A. and Hemler, M.E. (2007) Deletion of tetraspanin Cd151 results in decreased pathologic angiogenesis in vivo and in vitro. *Blood*, **109**, 1524-1532.
- Taylor, A.R., Robinson, M.B., Gifondorwa, D.J., Tytell, M. and Milligan, C.E. (2007) Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases. *Dev Neurobiol*, **67**, 1815-1829.
- Taylor, D.D., Akyol, S. and Gercel-Taylor, C. (2006) Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling. *J Immunol*, **176**, 1534-1542.
- Taylor, D.D. and Gercel-Taylor, C. (2005) Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *Br J Cancer*, **92**, 305-311.
- Theos, A.C., Truschel, S.T., Tenza, D., Hurbain, I., Harper, D.C., Berson, J.F., Thomas, P.C., Raposo, G. and Marks, M.S. (2006) A luminal domain-dependent pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis. *Dev Cell*, **10**, 343-354.
- Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G. and Clayton, A. (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*, **Chapter 3**, Unit 3 22.
- Thery, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J. and Amigorena, S. (2001) Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol*, **166**, 7309-7318.
- Thery, C., Duban, L., Segura, E., Veron, P., Lantz, O. and Amigorena, S. (2002) Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol*, **3**, 1156-1162.
- Thery, C., Ostrowski, M. and Segura, E. (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*, **9**, 581-593.

- Tozaki-Saitoh, H., Tsuda, M. and Inoue, K. (2011) Role of purinergic receptors in CNS function and neuroprotection. *Adv Pharmacol*, **61**, 495-528.
- Trajkovic, K., Dhaunchak, A.S., Goncalves, J.T., Wenzel, D., Schneider, A., Bunt, G., Nave, K.A. and Simons, M. (2006) Neuron to glia signaling triggers myelin membrane exocytosis from endosomal storage sites. *J Cell Biol*, **172**, 937-948.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brugger, B. and Simons, M. (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, **319**, 1244-1247.
- Trams, E.G., Lauter, C.J., Salem, N., Jr. and Heine, U. (1981) Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta*, **645**, 63-70.
- Trioulier, Y., Torch, S., Blot, B., Cristina, N., Chatellard-Causse, C., Verna, J.M. and Sadoul, R. (2004) Alix, a protein regulating endosomal trafficking, is involved in neuronal death. *J Biol Chem*, **279**, 2046-2052.
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J. and Lotvall, J.O. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, **9**, 654-659.
- van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M.S., Rubinstein, E. and Raposo, G. (2011) The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell*, **21**, 708-721.
- Van Niel, G., Mallegol, J., Bevilacqua, C., Candalh, C., Brugiere, S., Tomaskovic-Crook, E., Heath, J.K., Cerf-Bensussan, N. and Heyman, M. (2003) Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut*, **52**, 1690-1697.
- van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N. and Heyman, M. (2001) Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology*, **121**, 337-349.
- van Zon, A., Mossink, M.H., Scheper, R.J., Sonneveld, P. and Wiemer, E.A. (2003) The vault complex. *Cell Mol Life Sci*, **60**, 1828-1837.
- Veith, N.M., Plattner, H., Stuermer, C.A., Schulz-Schaeffer, W.J. and Burkle, A. (2009) Immunolocalisation of PrPSc in scrapie-infected N2a mouse neuroblastoma cells by light and electron microscopy. *Eur J Cell Biol*, **88**, 45-63.
- Vella, L.J., Greenwood, D.L., Cappai, R., Scheerlinck, J.P. and Hill, A.F. (2008) Enrichment of prion protein in exosomes derived from ovine cerebral spinal fluid. *Vet Immunol Immunopathol*, **124**, 385-393.
- Vella, L.J., Sharples, R.A., Lawson, V.A., Masters, C.L., Cappai, R. and Hill, A.F. (2007) Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol*, **211**, 582-590.
- Verderio, C., Coco, S., Fumagalli, G. and Matteoli, M. (1995) Calcium-dependent glutamate release during neuronal development and synaptogenesis: different involvement of omega-agatoxin IVA- and omega-conotoxin GVIA-sensitive channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 6449-6453.
- Viaud, S., Ploix, S., Lapierre, V., Thery, C., Commere, P.H., Tramalloni, D., Gorrichon, K., Virault-Rocroy, P., Tursz, T., Lantz, O., Zitvogel, L. and Chaput, N. (2011) Updated technology to produce highly immunogenic dendritic cell-derived exosomes of clinical grade: a critical role of interferon-gamma. *J Immunother*, **34**, 65-75.
- Vidal, M., Mangeat, P. and Hoekstra, D. (1997) Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *J Cell Sci*, **110 (Pt 16)**, 1867-1877.
- Vingtdeux, V., Hamdane, M., Loyens, A., Gele, P., Drobeck, H., Begard, S., Galas, M.C., Delacourte, A., Beauvillain, J.C., Buee, L. and Sergeant, N. (2007) Alkalizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies. *J Biol Chem*, **282**, 18197-18205.

- Vlassov, A.V., Magdaleno, S., Setterquist, R. and Conrad, R. (2012) Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*, **1820**, 940-948.
- Vo, N., Klein, M.E., Varlamova, O., Keller, D.M., Yamamoto, T., Goodman, R.H. and Impey, S. (2005) A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 16426-16431.
- von Bartheld, C.S. (2004) Axonal transport and neuronal transcytosis of trophic factors, tracers, and pathogens. *J Neurobiol*, **58**, 295-314.
- Von Bartheld, C.S. and Altick, A.L. (2011) Multivesicular bodies in neurons: distribution, protein content, and trafficking functions. *Prog Neurobiol*, **93**, 313-340.
- Wang, S., Cesca, F., Loers, G., Schweizer, M., Buck, F., Benfenati, F., Schachner, M. and Kleene, R. (2011) Synapsin I is an oligomannose-carrying glycoprotein, acts as an oligomannose-binding lectin, and promotes neurite outgrowth and neuronal survival when released via glia-derived exosomes. *J Neurosci*, **31**, 7275-7290.
- Wang, S., Jia, Z., Roder, J. and Murphy, T.H. (2002) AMPA receptor-mediated miniature synaptic calcium transients in GluR2 null mice. *J Neurophysiol*, **88**, 29-40.
- Wemmer, M., Azmi, I., West, M., Davies, B., Katzmann, D. and Odorizzi, G. (2011) Bro1 binding to Snf7 regulates ESCRT-III membrane scission activity in yeast. *J Cell Biol*, **192**, 295-306.
- White, I.J., Bailey, L.M., Aghakhani, M.R., Moss, S.E. and Futter, C.E. (2006) EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. *Embo J*, **25**, 1-12.
- Wightman, B., Ha, I. and Ruvkun, G. (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, **75**, 855-862.
- Wiser, O., Trus, M., Hernandez, A., Renstrom, E., Barg, S., Rorsman, P. and Atlas, D. (1999) The voltage sensitive Lc-type Ca²⁺ channel is functionally coupled to the exocytotic machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 248-253.
- Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Thery, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S. and Zitvogel, L. (2001) Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med*, **7**, 297-303.
- Wollert, T. and Hurley, J.H. (2010) Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*, **464**, 864-869.
- Wubbolts, R., Leckie, R.S., Veenhuizen, P.T., Schwarzmann, G., Mobius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J.W., Geuze, H.J. and Stoorvogel, W. (2003) Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem*, **278**, 10963-10972.
- Xin, H., Li, Y., Buller, B., Katakowski, M., Zhang, Y., Wang, X., Shang, X., Zhang, Z.G. and Chopp, M. (2012) Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. *Stem Cells*, **30**, 1556-1564.
- Yu, X., Harris, S.L. and Levine, A.J. (2006) The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res*, **66**, 4795-4801.
- Yu, X., Riley, T. and Levine, A.J. (2009) The regulation of the endosomal compartment by p53 the tumor suppressor gene. *Febs J*, **276**, 2201-2212.
- Zernecke, A., Bidzhikov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., Hristov, M., Koppel, T., Jahantigh, M.N., Lutgens, E., Wang, S., Olson, E.N., Schober, A. and Weber, C. (2009) Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*, **2**, ra81.
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G. and Amigorena, S. (1998) Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med*, **4**, 594-600.
- Zylbersztein, K. and Galli, T. (2011) Vesicular traffic in cell navigation. *Febs J*, **278**, 4497-4505.

Appendix

Article 1 : Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity

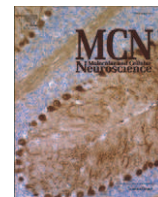
Lachenal G, Pernet-Gallay K, Chivet M, Hemming FJ, Belly A, Bodon G, Blot B, Haase G, Goldberg Y, Sadoul R.

[Mol Cell Neurosci](#). 2011 Feb;46(2):409-18. doi: 10.1016/j.mcn.2010.11.004. Epub 2010 Nov 25.

Article 2 : Emerging role of neuronal exosomes in the central nervous system.

Chivet M, Hemming F, Pernet-Gallay K, Fraboulet S, Sadoul R.

[Front Physiol](#). 2012;3:145. doi: 10.3389/fphys.2012.00145. Epub 2012 May 28.



Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity

Gaëlle Lachenal^{a,c}, Karin Pernet-Gallay^{b,c}, Mathilde Chivet^{a,c}, Fiona J. Hemming^{a,c}, Agnès Belly^{a,c}, Gilles Bodon^{a,c}, Béatrice Blot^{a,c}, Georg Haase^d, Yves Goldberg^{a,c}, Rémy Sadoul^{a,c,*}

^a INSERM, U836, Equipe 2, Neurodégénérescence et Plasticité, Grenoble, F-38042, France

^b INSERM, U836, Equipe 1, Physiopathologie du Cytosquelette, Grenoble, F-38042, France

^c Université Joseph Fourier, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, F-38042, France

^d CNRS & Université de la Méditerranée, UMR 6196, Plasticité et Physio-Pathologie de la Motricité, F-13402 Marseille cedex 20, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 June 2010

Revised 15 October 2010

Accepted 12 November 2010

Available online 25 November 2010

Keywords:

Exosomes

Multivesicular bodies

Tetanus toxin

Synaptic activity

ABSTRACT

Exosomes are microvesicles released into the extracellular medium upon fusion to the plasma membrane of endosomal intermediates called multivesicular bodies. They represent ways for discarding proteins and metabolites and also for intercellular transfer of proteins and RNAs. In the nervous system, it has been hypothesized that exosomes might be involved in the normal physiology of the synapse and possibly allow the trans-synaptic propagation of pathogenic proteins throughout the tissue. As a first step to validate this concept, we used biochemical and morphological approaches to demonstrate that mature cortical neurons in culture do indeed secrete exosomes. Using electron microscopy, we observed exosomes being released from somato-dendritic compartments. The endosomal origin of exosomes was demonstrated by showing that the C-terminal domain of tetanus toxin specifically endocytosed by neurons and accumulating inside multivesicular bodies, is released in the extracellular medium in association with exosomes. Finally, we found that exosomal release is modulated by glutamatergic synaptic activity, suggesting that this process might be part of normal synaptic physiology. Thus, our study paves the way towards the demonstration that exosomes take part in the physiology of the normal and pathological nervous system.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Cell to cell communication can occur through exchange of membrane vesicles. Some are generated inside endosomes and released upon fusion to the plasma membrane of endosomal intermediates called multivesicular bodies (MVBs) (Pan et al., 1985). In this latter case, the released intraluminal vesicles are referred to as exosomes. Since their original discovery in reticulocytes, exosomes were found to be secreted by an increasing number of cells and could be isolated from most body fluids including cerebral spinal fluid (Vella et al., 2008a). However, in most cases their physiological relevance has been difficult to show due to a lack of information on their biogenesis, origin and regulation.

MVB intraluminal vesicles contain proteins meant for degradation, which occurs upon fusion of the limiting membrane of MVBs with lysosomes (Futter et al., 1996). Until a decade ago, their release as exosomes was mainly regarded as a way of eliminating membrane

material from cells, or cell compartments, lacking lysosomes. Exosomes also represent an alternative pathway for the secretion of soluble proteins lacking signal sequences, or of membrane proteins (Qu et al., 2007; Zhang et al., 2006). Other functions deal with intercellular communication, as in the case of naïve dendritic cells, which become immuno-competent after binding and endocytosis of exosomes secreted by other activated dendritic cells (Morelli et al., 2004; Thery et al., 2002). Exosomes released by mast cells were reported to contain RNAs including microRNAs and mRNAs, which modulate the protein expression of receiving cells (Skog et al., 2008; Valadi et al., 2007). Thus, exosomes represent a way of transferring material between cells, allowing emitting cells to modify the protein expression of the receiving cells.

Exosomes have been proposed to be a novel way for intercellular communication contributing to the normal physiology of the nervous system and to the trans-synaptic transmission of pathogenic proteins (Fevrier et al., 2005; Smalheiser, 2007; Vella et al., 2008b). In line with this, several reports have described the release of exosomes by cultured astrocytes (Taylor et al., 2007), microglial cells (Poticchio et al., 2005), oligodendrocytes (Krämer-Albers et al., 2007) and developing neurons (Faure et al., 2006). However there has been no definite proof that mature neurons can secrete exosomes or that this process is regulated by neuronal activity. Here we demonstrate that i) fully differentiated cortical and hippocampal neurons in culture do

Abbreviations: DIV, days *in vitro*; EM, electron microscopy; GFP, green fluorescent protein; HRP, horse radish peroxidase; MVB, Multivesicular body; TTC, C-terminal half of the tetanus toxin heavy chain.

* Corresponding author. Grenoble Institute of Neuroscience, Chemin Fortuné Ferrini, BP 170, F-38042 Grenoble, France. Fax: +33 4 56 52 05 54.

E-mail address: remy.sadoul@ujf-grenoble.fr (R. Sadoul).

indeed secrete vesicles having the biochemical and morphological features of exosomes, ii) these vesicles do correspond to intraluminal vesicles of MVBs since they contain on their surface TTC, the C-terminal domain of tetanus-toxin, which is endocytosed by neurons and accumulates inside MVBs and iii) exosomal secretion by neurons is regulated by calcium influx and by glutamatergic synaptic activity. Thus our results definitively endorse the role of exosomes in the normal physiology of the central nervous system.

Results

Exosomal release from mature neurons is regulated by calcium

Exosomes are homogeneous in size (40–100 nm) and shape and even though their protein composition depends on the cell type of origin, some proteins like Alix or Flotillin-1 have emerged as exosomal marker proteins (Mathivanan and Simpson, 2009). We have previously demonstrated that primary neurons from E 19 rat cortex cultured for 9 days release exosomes and that this release is stimulated during prolonged depolarisation (3 h) with medium containing 25 mM KCl (Faure et al., 2006). These cultures are not fully differentiated, meaning that neurite outgrowth still occurs and that very few synapses can be observed. In order to show that exosomal release is not only a property of developing neurons, we used here cortical neurons cultured for 15 days to allow full differentiation (Chiappalone et al., 2006). After washing, the cultures were incubated in harvesting medium containing 5 mM KCl (K5) or in the same medium containing 25 mM KCl (K25). Media were harvested after 3 h, vesicles pelleted by ultracentrifugation and further separated using a continuous sucrose gradient. As shown in Fig. 1, immunoblotting of each fraction using an antibody against Flotillin-1 revealed weak immunoreactivity in fraction 5 from K5 cell-supernatants and strong reactivity peaking between fractions 4 and 7 from K25 supernatants. This corresponds to densities of 1.09 and 1.15 g/ml sucrose, as expected for exosomes (Fig. 1). Alix was mainly detected in fractions 4 to 6 of K25 supernatants. The cell adhesion molecule L1, a transmembrane protein, which in the central nervous system is only expressed by neurons (Maness and Schachner, 2007),

was present in exosomal fractions of the same supernatants showing that exosomes are released by neurons. Immunoreactivity against GluR2/3 showed that the subunits of AMPA receptors are also secreted by way of exosomes. These results demonstrate that mature neurons secrete exosomes and that this process is enhanced by depolarisation.

In order to examine whether this secretion can be regulated, we next used a harvesting time of 5 min to avoid long term effects of treatments on endosomal trafficking. Using 100 000 g centrifugation, we found that harvested media contained pelletable material positive for Alix, Flotillin-1 and L1 (Fig. 2). In this case the amount of material was too small to allow separation over sucrose gradients; we therefore used electron microscopy to demonstrate that the 100 000 g pellets contained exosomes. Indeed, released vesicles harvested after 5 min had the size (50–100 nm) and erythrocyte-like shape typical of exosomes (Fig. 2D). The neuronal origin of these vesicles was demonstrated by their labelling with antibodies against L1 and the AMPA receptor subunit GluR2 (Fig. 2D, bottom panel).

Using a 5 min harvest, we found that the incubation of neurons with the calcium ionophore ionomycin to induce calcium influx, significantly increased exosomal release (Fig. 2A,B). Similar results were found using 21 DIV hippocampal neurons (Fig. 2C). The preincubation of cortical neurons for 15 min with BAPTA-AM, to chelate intracellular calcium, partially blocked the ionomycin effect, thus demonstrating that the enhancement of exosomal release observed during a 5 min incubation with the ionophore is indeed due to an increase in the intracellular calcium (Fig. 2E,F).

Electron-microscopic examination of cultured neurons reveals the presence of released exosomes in close apposition to the plasma membrane

Electron microscopic examination of 15 DIV cortical neurons treated 1 min with ionomycin showed the presence of extracellular clusters of vesicles in close vicinity of the plasma membrane of dendrites (Fig. 3B right panel) and of the soma (Fig. 3B left panel). Similar clusters were seen, albeit less frequently, on the surface of untreated 15 DIV (not shown) or 8 DIV cultures (Fig. 3A). The size (40 to 80 nm) was compatible to the one of the vesicles harvested from culture supernatants (Fig. 2D). Moreover the size and number of

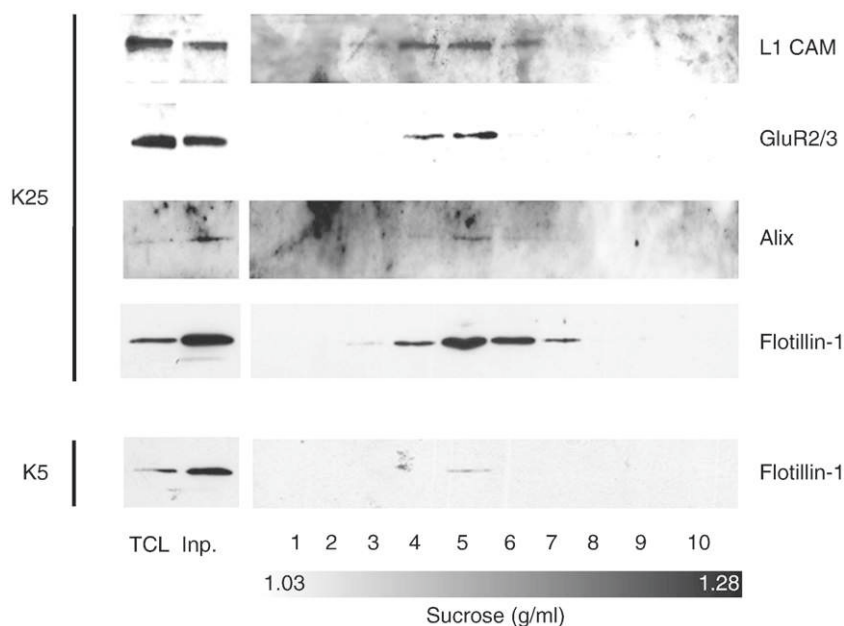


Fig. 1. Western blot analysis of secreted vesicles separated on a continuous density gradient. After washing, 15 DIV cortical neurons were incubated in fresh K5 medium or depolarising medium containing 25 mM KCl (K25). 3 h later, vesicles harvested from 3.6×10^7 cells were pelleted at 100 000 g. The vesicles were then separated on a continuous sucrose gradient. One ml fractions were collected and analysed by Western blot using antibodies against L1, GluR2/3, Alix and Flotillin-1. (TCL: total cell lysates; Inp: 10% of the vesicles pelleted at 100 000 g before separation on the sucrose gradient.)

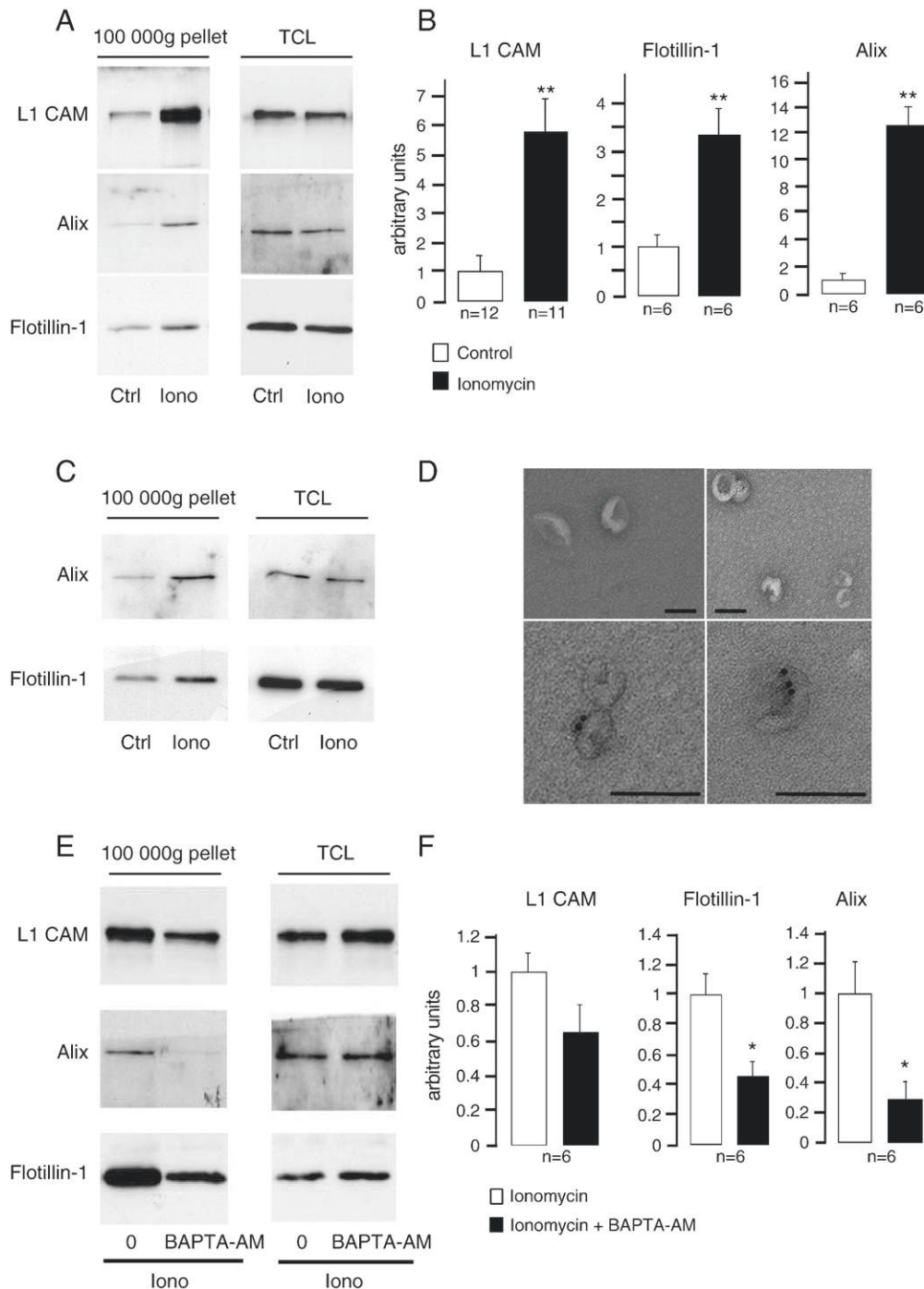


Fig. 2. Exosomal secretion is regulated by calcium. A,B,C: *increase of exosomal release by ionomycin*. A. Cortical neurons (15 DIV) were incubated for 5 min in fresh medium (Ctrl.) or in fresh medium containing 2 μ M ionomycin. Exosomes released during these 5 min incubations were pelleted at 100 000 g and analysed by Western-blot using the indicated antibodies (Ctrl: control medium; Iono: ionomycin; and TCL: total cell lysates) B. L1, Flotillin-1 and Alix immuno-reactivities as shown in A were quantified by densitometry (Wilcoxon test, *: 0.01 < p < 0.05, ** 0.001 < p < 0.01). C. Hippocampal neurons (21 DIV) were incubated for 5 min in fresh medium (Ctrl) or in fresh medium containing 2 μ M ionomycin (Iono). Exosomes released during these 5 min incubations were pelleted at 100 000 g and analysed by Western-blot using the indicated antibodies. (TCL: total cell lysate) D. *Characterisation of exosomes released during 5 min*. Electron microscopy examination of vesicles secreted by 15 DIV cortical neurons during 5 min and pelleted at 100 000 g (bar: 100 nm). Bottom panels: immunogold labelling of the same preparation using antibodies against L1 CAM (left) and GluR2 (right). E. *BAPTA-AM inhibits the increase of exosomal release due to ionomycin*. Cortical neurons were preincubated for 15 min in medium with or without 50 μ M BAPTA-AM. Neurons were then washed and incubated in fresh medium containing 2 μ M ionomycin during the 5 min harvest. Exosomes were pelleted at 100 000 g and analysed by Western blots using the antibodies indicated. F. L1, Flotillin-1 and Alix immunoreactivities as shown in E were quantified using densitometry. (Wilcoxon test, *: 0.01 < p < 0.05, **: 0.001 < p < 0.001).

vesicles were also in the same range as those observed inside MVBs (Fig. 3A,B). In rare cases, the profiles of MVB compartments in continuity with the plasma membrane could be observed (Fig. 3C). Dense material probably contained in MVBs was released together with exosomes.

GFP-TTC is released by way of exosomes

In order to further prove that exosomes harvested by centrifugation and observed in association with the plasma membrane originate in neuronal endosomal compartments, we made use of TTC, the C

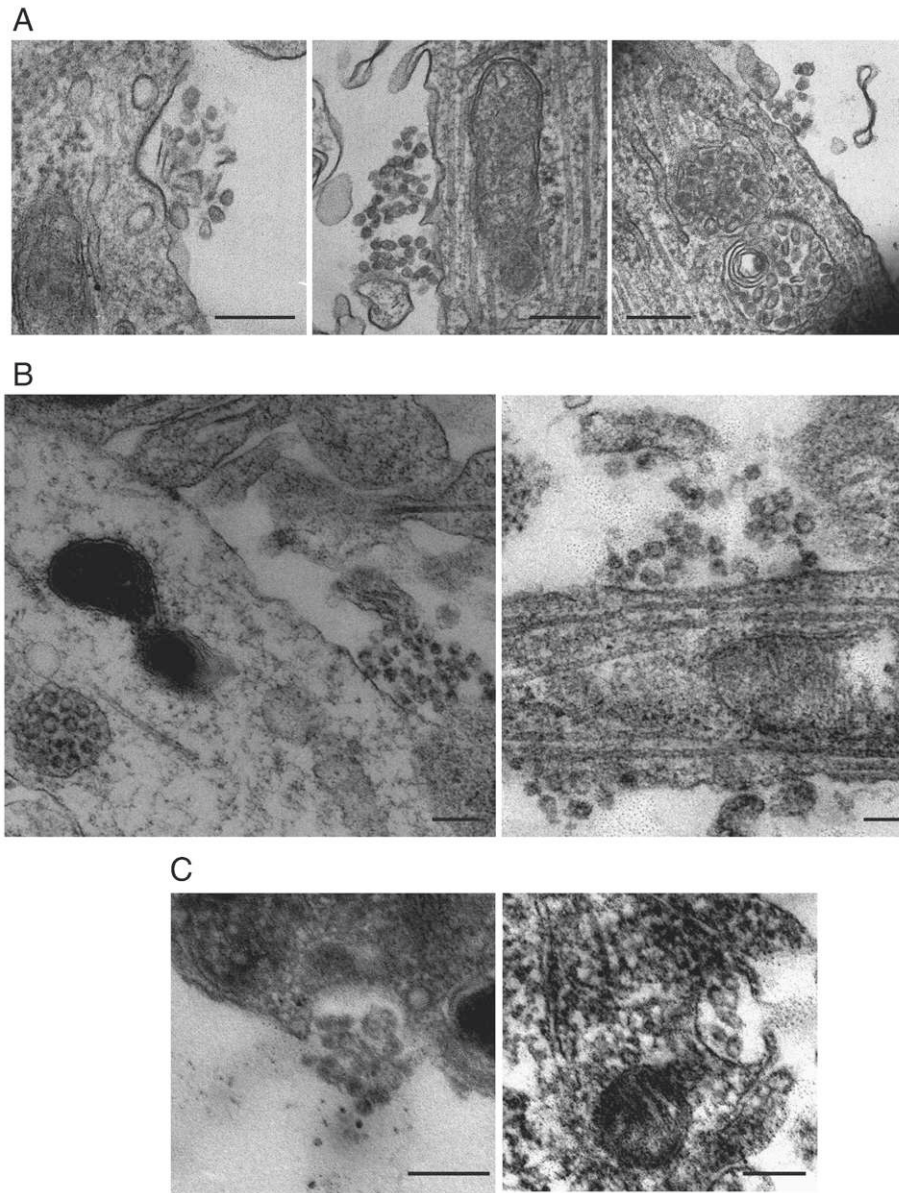


Fig. 3. Clusters of exosomes are released by cortical neurons in culture. A. Electron microscopy of cortical neurons (8 DIV) in culture shows extracellular clusters of vesicles having the size and shape of MVB intraluminal vesicles, which are loosely associated with the plasma membrane. B. The same kind of figures can be seen on soma and dendrites of cortical neurons at 15 DIV, washed and incubated 1 min in fresh medium containing 2 mM ionomycin before fixation. C: Figures of exocytosis, which could represent fusion of MVBs with the plasma membrane. Bar: 200 nm for A,B,C.

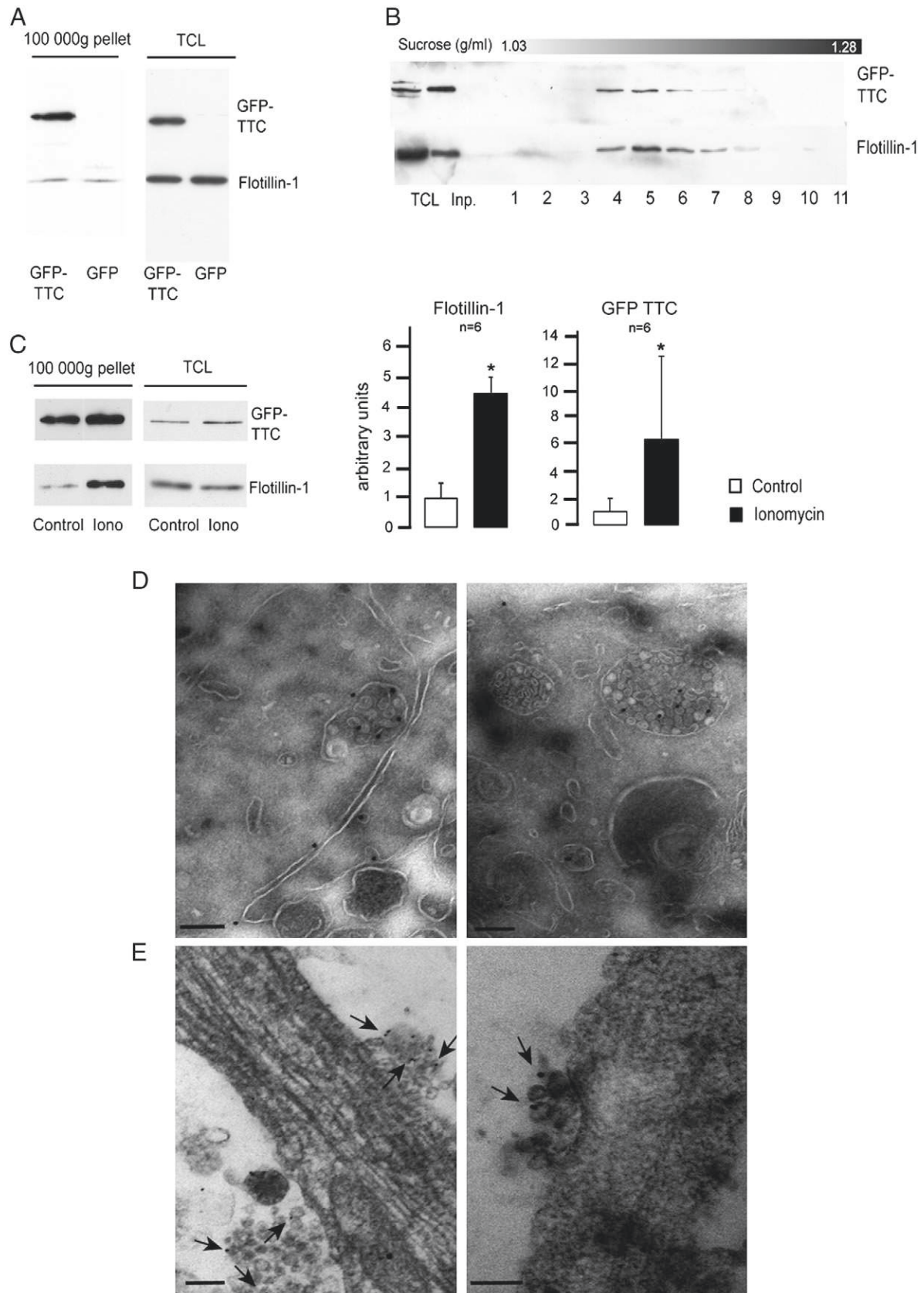
terminal 451-amino-acid fragment of the Tetanus toxin heavy chain. Numerous observations have shown that the recombinant protein fused to GFP or enzymes, binds specifically to- and is endocytosed by neurons similarly to the native toxin (Bordet et al., 2001; Francis et al., 2004). Here we produced GFP-tagged TTC (GFP-TTC) and GFP as recombinant GST fusion proteins in bacteria. Cortical neurons cultured for 15 DIV were then incubated for 1 h at 37 °C with GFP-

TTC or GFP before extensive washing. Using epi-fluorescence, endocytosed GFP-TTC was seen inside punctuate structures in both soma and dendrites, whereas GFP alone was undetectable (not shown). To test whether GFP-TTC is secreted in association with exosomes, neurons pre-incubated with GFP-TTC or GFP, were extensively washed and incubated in fresh medium. The media were harvested after 5 min, exosomes centrifuged at 100 000 g and

Fig. 4. GFP-TTC is secreted in association with neuronal exosomes. A. Cortical neurons were incubated at 37 °C with GFP-TTC or GFP (4 µg/ml), before extensive washing. Exosomes secreted for 5 min were pelleted by 100 000 g centrifugation (100 000 g pellet) and analysed by Western blot using anti-GFP and anti-Flotillin-1 antibodies. (TCL: total cell lysates). B. Cortical neurons (15 DIV) were incubated with GFP-TTC, extensively washed and depolarised by incubation with fresh medium containing 25 mM KCl. After 2 h, culture supernatants were harvested and vesicles pelleted at 100 000 g (Inp). Vesicles were further separated on a sucrose density gradient. 1 ml fractions were collected and analysed by Western blot using anti-GFP and anti-Flotillin-1 antibodies. (TCL: total cell lysates). Right hand panel: Flotillin and GFP-TTC immunoreactivities were estimated using densitometry. (Wilcoxon test, *: 0.01 < p < 0.05). C. Increased secretion of GFP-TTC bound exosomes induced by ionomycin: 15 DIV neurons were incubated 1 h at 37 °C with GFP-TTC before extensive washing. Neurons were incubated with fresh medium containing 2 µM ionomycin during the 5 min time of harvest. Exosomes were pelleted by 100 000 g centrifugation and analysed by Western blot using anti-GFP and anti-Flotillin-1 antibodies. (TCL: total cell lysates). D. Cortical neurons (15 DIV) were pre-incubated with GFP-TTC, washed and processed for cryosections. GFP was detected using an anti-GFP and Protein A coupled to immunogold (bars: 200 nm). E. Cortical neurons (15 DIV) pre-incubated with GFP-TTC as in A and B were fixed and labelled with GFP antibodies and Protein A coupled to gold beads before embedding. Sections were prepared and examined by EM. Arrows show GFP labelling on exosomes in clusters close to the plasma membrane (bars: 200 nm).

analysed by Western-blotting using anti-GFP and anti-Flotillin-1 antibodies. GFP-TTC, but not GFP, was present in these 100 000 g pellets (Fig. 4A). The amount of the released GFP-TTC pelleted by

ultracentrifugation was significantly increased upon the treatment of neurons with 2 μ M ionomycin further suggesting that GFP-TTC is released in association with exosomes (Fig. 4C). We next used density



separation to further prove that after endocytosis by neurons, GFP–TTC is secreted in association with exosomes. Neurons were preincubated with GFP–TTC, extensively washed and vesicles harvested during 2 h were further separated on a sucrose gradient. Western blotting analysis using antibodies against GFP revealed a peak of GFP–TTC in the 1.12 g/ml fraction, in which Flotillin positive exosomes are concentrated (Fig. 4B). As expected from the result shown in Fig. 4A, no GFP could be detected in any fractions of exosomes prepared from neurons which had been pre-incubated with GFP alone (not shown). The most straight-forward explanation as to why GFP–TTC is detected at this sucrose density is that it is bound to exosomes. These data prove that exosomes secreted by neurons stem from the intracellular compartments, which contain endocytosed proteins.

In order to demonstrate that these endosomes are indeed MVBs, we used immunogold to label cryosections of cultured neurons pre-incubated with GFP–TTC. As shown in Fig. 4D, some of the anti-GFP labelling was found inside MVB compartments which is in good agreement with data from Schiavo and collaborators using recombinant TTC coupled to horse radish peroxidase (Deinhardt et al., 2006).

Anti-GFP labelling before the inclusion and sectioning of the cultured neurons pre-incubated with GFP–TTC, demonstrated the presence of immunogold labelling on exosomes present in the extracellular clusters at the neuron surface (Fig. 4E). Thus, our experiments strongly suggest that the packets of exosomes seen in association with dendrites of 15 DIV cultured neurons correspond to intraluminal vesicles of MVBs released upon the fusion of the latter with the plasma membrane.

Exosome secretion is regulated by glutamatergic activity

We finally tested whether secretion of exosomes might be regulated by synaptic activity. For this we used two antagonists of GABA_A receptors, bicucullin or picro-toxin, to block inhibitory activity in the cultures and thereby enhance glutamatergic spontaneous activity. As shown in Fig. 5A and B, a massive increase in the release of exosomes detected by Flotillin-1, Alix and L1 was detectable after a 10 min treatment with bicucullin. Antibodies against the Na⁺/K⁺ ATPase, a plasma membrane resident protein, did not reveal the presence of the protein in the same fractions, thus demonstrating that the vesicles harvested from the neurons treated with or without bicucullin do not contain plasma membrane contaminants (not shown). The addition of the AMPAR antagonist CNQX to the cultures together with bicucullin inhibited this increase, demonstrating that the secretion is modulated by synaptic AMPA receptor activity. MK-801, which antagonises NMDA receptors also blocked the bicucullin induced increase in exosome secretion (Fig. 5A,B). Therefore exosome secretion is modulated by synaptic AMPA- and NMDA-receptors. Picrotoxin also increased the release of exosomes immuno-revealed using anti-Flotillin and GluR2 further demonstrating that this process is regulated by glutamatergic activity (Fig. 5C).

Discussion

Vesicles released from living cells are the subject of numerous studies as they represent ways of secreting cytoplasmic proteins, membrane proteins and RNAs (Belting and Wittrup, 2008). The secretion of membrane particles was demonstrated to occur directly from the plasma membrane of neuroepithelial cells (Marzesco et al., 2005), microglia (Bianco et al., 2005), astrocytes (Bianco et al., 2009) or glioblastoma cells (Skog et al., 2008). Vesicles can also be released from the intracellular compartments of unknown origin as in the case of enlarge osomes released by PC12 cells (Borgonovo et al., 2002). The best-characterised membrane vesicles are exosomes, which correspond to intraluminal vesicles of MVBs released after the fusion of the latter to the plasma membrane (Simons and Raposo, 2009). Exosomes represent a

way of intercellular exchange of both RNAs and proteins, which allows emitting cells to modify protein expression in receiving cells. In the adult nervous system exosomes were hypothesized to supplement the known mechanisms of anterograde and retrograde signalling across synapses i.e. represent a novel way for the intercellular exchange of material within neural networks (Smalheiser, 2007; Aguzzi and Rajendran, 2009; Vella et al., 2008b). Even appealing, this hypothesis faces the lack of demonstration of exosomal release by mature neurons. Among the reports claiming the secretion of exosomes by neurons (Ghidoni et al., 2009; Putz et al., 2008; Vingtdoux et al., 2007), only Ghidoni et al. (2009) separated by density centrifugation exosomes from the other vesicles harvested from culture supernatants. None of the reports used markers to ensure the neuronal origin of the secreted vesicles. Furthermore, no demonstration was made of the endosomal origin of the putative exosomes. Finally all these reports used embryonic neurons cultured for only 3 to 7 days; our previous demonstration of the exosome release by neurons made use of embryonic cortical neurons cultured for 8 to 9 days (Faure et al., 2006). In such cultures, neurite outgrowth is still ongoing and exosomal release might simply reflect the fusion of late endosomes–lysosomes at growth cones, a process necessary for neurite elongation (Arantes and Andrews, 2006). Here we used several approaches to show that cortical neurons cultured for 15 days, which have undergone synaptogenesis and made functional networks (Chiappalone et al., 2006) release exosomes. We also show that exosomal release is regulated by synaptic glutamatergic activity and might thus be part of normal synaptic physiology.

Our demonstration that the features of vesicles released by differentiated neurons correspond to those of exosomes is five fold: 1) their floating between 1.09 and 1.15 g/ml of sucrose; 2) their characteristic Alix and Flotillin-immunoreactivities; 3) their size and shape as observed by electron microscopy; 4) their association with the C-terminal half of tetanus toxin which is endocytosed specifically by neurons and accumulates inside MVBs; and 5) the presence of clusters of vesicles near dendrites, which have the size and shape similar to those found inside MVBs and are labelled with GFP–TTC.

As in the case for exosomes secreted from 8 DIV cultures (Faure et al., 2006), exosomes released by 15 DIV neurons carried the cell adhesion molecule L1 and GluR2/3 subunits of the AMPA receptors. The presence of both proteins inside MVBs, which was reported by others (Utvik et al., 2009; Yap et al., 2008), is compatible with our conclusion that exosomes characterised in our study indeed correspond to the MVB intraluminal vesicles of neurons. We verified that this is indeed the case by making use of GFP–TTC. In primary cultures, this protein is specifically endocytosed by neurons, a property afforded by TTC which binds to cell surface gangliosides and a GPI-linked receptor (Bordet et al., 2001; Herreros et al., 2001). In agreement with published results, we observed by EM that the endocytosed protein accumulates inside neuronal MVBs. The enrichment of GFP–TTC in sucrose fractions containing exosomes harvested from neurons having endocytosed GFP–TTC demonstrated that the water soluble protein is bound to exosomes. The protein was also detected by EM on exosomes present in the extracellular clusters close to the neuronal surface. Altogether these findings demonstrate that endocytosed GFP–TTC is secreted by way of exosomes and that neuronal exosomes characterised throughout our study stem from MVBs.

Thus, our finding that 15 DIV mature cortical neurons secrete exosomes at the level of soma and dendritic shafts was crucial to demonstrate that this process might be part of the physiology of differentiated neuron and is unrelated to the growth cone development.

Even if several cell stimuli lead to an increase in exosome secretion by non neuronal cells (Thery et al., 2009), there is today no clear indication that MVB fusion is regulated. In most cell types, a rise in cytosolic calcium is necessary to induce regulated secretion (Gerber and Sudhof, 2002). The lack of information about a possible calcium dependent fusion of MVBs to the plasma membrane is due to the length of exosome harvest necessary to detect exosomes (ranging

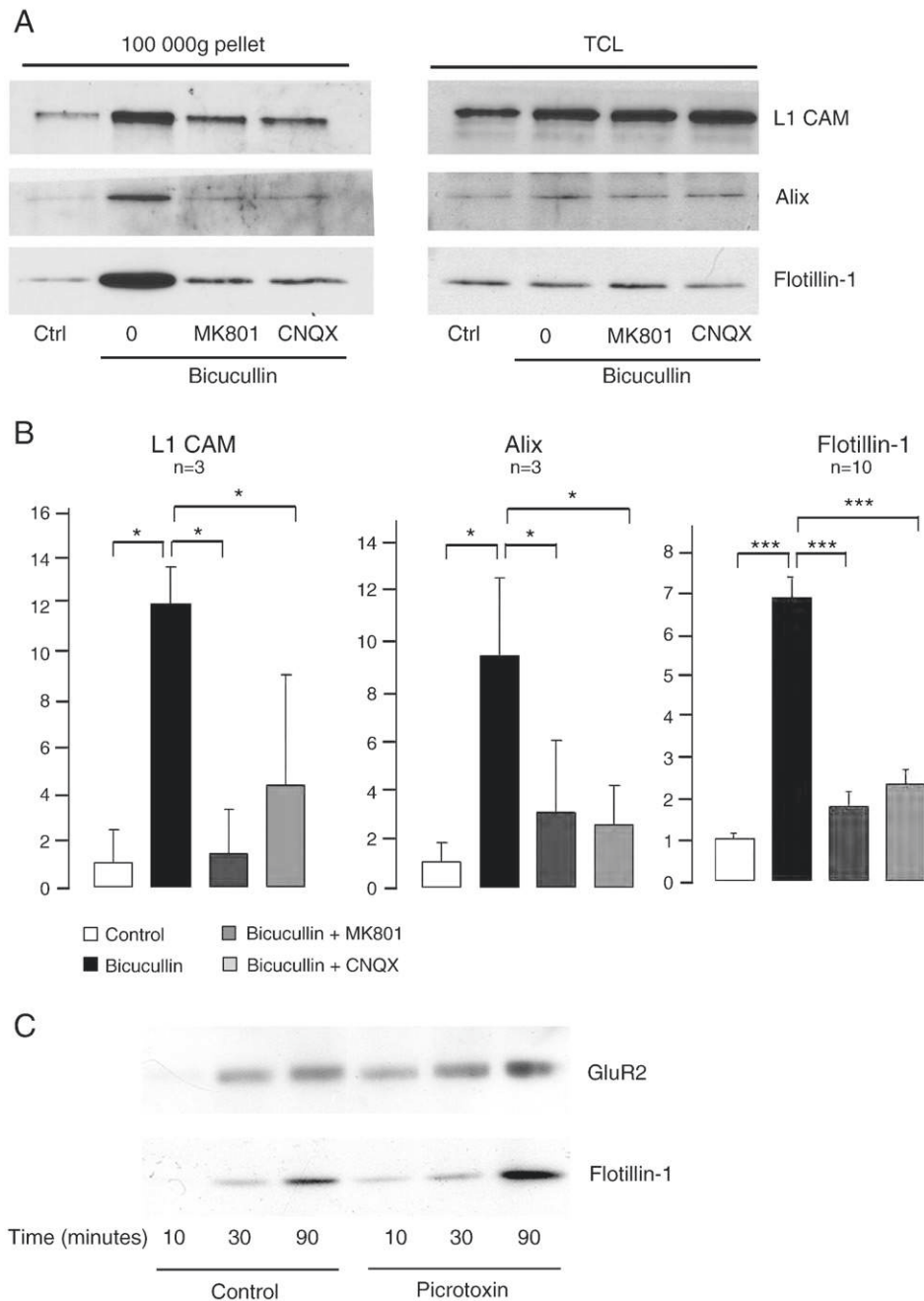


Fig. 5. Exosomal release is regulated by glutamatergic synaptic activity. **A.** Cortical neurons (15 DIV) were washed and incubated 10 min in fresh medium (Ctrl) or the same medium containing 40 μ M bicucullin, in the absence (0) or in the presence of 1 μ M MK801 or of 100 μ M CNQX. Thereafter, media were collected and exosomes pelleted at 100 000 g (100 000 g pellet) and analysed by Western blot using the antibodies indicated. TCL: total cell lysate. **B.** L1, Alix and Flotillin immunoreactivities as shown in **A** were quantified (Anova test, *: 0.01 < p < 0.05, ** 0.001 < p < 0.01). **C.** Cortical neurons (15 DIV) were incubated in K5 medium containing 40 μ M picrotoxin. The incubation media were harvested after 10, 30 and 90 min, exosomes pelleted at 100 000 g and analysed by Western blot using the indicated antibodies.

from several hours to several days) (see for example Fader et al., 2008; Ostrowski et al., 2010; Savina et al., 2005). Such a long-term rise in calcium could be misleading in that it affects endosomal traffic and potentially the number of MVBs without regulating secretion *per se*. The best evidence, so far, for a role of calcium in exosomal release was given by Qu et al., who reported, a slight increase in the exosomal release by macrophages during a 15 min ATP stimulation (Qu et al., 2009). Here we managed to show a strong increase in the exosomal release from the mature neurons within 5 min of the ionomycin treatment, which is abolished by BAPTA-AM. Using EM we also found that the number of extracellular clusters near neuronal surfaces is increased upon the 1 min treatment with ionomycin. Even if this is to

our knowledge, the best suggestion so far that calcium regulates the fusion of MVBs to the plasma membrane, the definite proof will await real time video microscopy to study this process.

By analogy to other cells, one might consider exosomes as a way of discarding proteins. In the cortex and hippocampus, the regulation of the number of ionotropic glutamate receptors expressed at the post-synaptic membrane is crucial to modulate the efficacy of synapses. It is now well documented that this regulation involves calcium regulated endocytosis and exocytosis from endosomal pools of receptors but little is known about how degradation contributes to this equilibrium (Kennedy and Ehlers, 2006; Newpher and Ehlers, 2008). The presence of GluR2 subunits in neuronal exosomes together with the enhanced

secretion of exosomes following glutamatergic synaptic activation, underlines exosomal release as a possible mechanism for the local elimination of receptors at synapses undergoing plastic changes. The loss of AMPA receptors upon extensive synaptic activation could be a mechanism of homeostatic synaptic scaling, which is necessary to adjust the strength of all of a neuron's excitatory synapses to stabilize firing (Turriano, 2008). As distal dendrites are devoid of lysosomes, the regulation of the pool of surface synaptic receptors by exosome secretion would avoid retrograde transport of MVBs to lysosomes in proximal dendrites and soma. *In vivo*, MVBs are relatively sparse and mostly found within dendritic shafts but rarely inside spines (Cooney et al., 2002). However, movements or maturation of MVBs in spines is tightly regulated by synaptic activity or neurotrophic factors (Popov et al., 2008; Rind et al., 2005). One important step will now be to test whether the fusion of MVBs to the plasma membrane occurs at the level of spines or of dendritic shafts.

The exosomes released by mast cells and dendritic cells were shown to be captured by other cells which can make use of the exosomal proteins and RNAs (Morelli et al., 2004; Thery et al., 2002). If such mechanisms allow the material transfer between neurons they would be ideally suited to regulate the protein expression and thereby plasticity inside neuronal networks (Smalheiser, 2007). In line with this, a recent report, Korkut et al. demonstrated a vesicular trans-synaptic communication of Wnt at the *Drosophila* neuromuscular junction and suggested that this occurs through exosome transfer (Korkut et al., 2009). The exosomal transfer would also allow the spreading of pathogenic agents throughout the central nervous system during the course of neurodegenerative diseases (Aguzzi and Rajendran, 2009; Vella et al., 2008b). The fact that TTC is secreted by way of exosomes adds some weight to this hypothesis since *in vivo* the recombinant protein behaves like intact Tetanus toxin, being endocytosed at synapses, retrogradely transported inside endosomes and crossing synapses (Cordero-Erausquin et al., 2009; Maskos et al., 2002; Deinhardt et al., 2006). Our present work showing that differentiated neurons secrete exosomes stemming from MVBs in a way regulated by synaptic activity is a first step towards the demonstration of their function in the normal and pathological nervous system.

Experimental methods

Reagents

Polyclonal anti-Alix has been previously described (Chatellard-Causse et al., 2002). Polyclonal anti-L1 CAM was a kind gift of F. Rathjen (Max-Delbrück-Centrum, Berlin, Germany). Polyclonal anti-GluR2 and anti-GluR2/3 were purchased from Millipore and Chemicon respectively. Monoclonal antibody against the N-terminal part of GluR2 used for electron microscopy was from Chemicon. Monoclonal anti-GFP was from Covance, and monoclonal antibody against Flotillin-1 was obtained from BD Transduction Laboratories.

Ionomycin, picrotoxin, CNQX, MK801 were purchased from Sigma and bicucullin from Fluka.

TTC proteins: construction of pGEX plasmids coding for GST–GFP–TTC or GST–GFP have been described in Bordet et al. (2001). Proteins were expressed in BL21 *E. coli* and purified on a glutathion-Sepharose 4b column (Amersham) as described (Bordet et al., 2001). After dialysis against PBS containing 0.5 M NaCl and 5% glycerol, proteins were centrifuged at 100 000 g for 1 h to remove insoluble proteins. Fusion proteins were incubated on neurons at 4 µg/ml in culture medium.

Primary cultures of cortical and hippocampal neurons

Cells were prepared from embryonic day 19 (E19) rat embryos as described (Faure et al., 2006). After the dissociation cortical neurons

were seeded at 10^5 cells/cm² onto 100 mm dishes precoated with poly-D-lysine (50 µg/ml, Sigma). Hippocampal neurons, cells were seeded at 1.3×10^4 cells/cm². Cells were cultured in Neurobasal (Gibco) supplemented with 2% B27 (Gibco), 1 mM sodium pyruvate, 2 mM glutamine and antibiotics in a humidified incubator at 37 °C and 5% CO₂. 25% freshly made medium containing cytosine β-D-arabinooside (AraC) at a final concentration of 10 µM (cortical neurons) or 5 µM (hippocampal neurons) was added every 4th day. Immunostaining of 15 DIV cultures with a monoclonal antibody against GFAP, revealed staining of only 1 to 2% of cells, demonstrating minimal contamination by astrocytes.

Purification of exosomes

Exosomes were purified from 15 DIV cortical neurons or from 21 DIV hippocampal neurons. Cells were washed two times in K5 medium (5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 110 mM NaCl, 26 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 0.7% D-glucose and 15 mM HEPES, pH 7.4). Cells were then incubated in the same medium, with or without stimulation, for the indicated times of harvest, after which media were collected and cleared of debris by two successive centrifugation steps (2000 g for 10 min, 20 000 g for 20 min) and filtration through a 0.22 µm filter (GVA, Millipore). The exosomes were recovered by centrifugation for 50 min at 100 000 g. They were resuspended in Laemmli buffer for Western blot analysis or further separated over a sucrose gradient. For this, the 100 000 g pellets were resuspended in sucrose 0.211 M, 3 mM imidazole pH 7.4, and loaded onto a continuous 0.211 M to 2.255 M sucrose gradient. Gradients were centrifuged 18 h at 100 000 g, and 1 ml fractions were collected, diluted in 3 mM Imidazole, pH 7.4, and centrifuged for 1 h at 100 000 g. Pellets were resuspended in Laemmli buffer and analysed by Western-blot.

For short term harvests each lane corresponds to exosomes pelleted at 100 000 g from the medium of 1.2×10^7 cells (estimated at the time of seeding). Gradient analyses were performed using vesicles recovered from the media of 3.6×10^7 cells.

Cells were lysed in the RIPA buffer and the equivalent of 6×10^3 cells/lane were loaded.

Treatments included: depolarisation by incubation in K25 (25 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 90 mM NaCl, 26 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 0.7% D-glucose and 15 mM HEPES, pH 7.4). All other treatments were performed for the times indicated in K5 medium: ionomycin was used at 2 µM, BAPTA-AM at 50 µM, bicucullin and picrotoxin at 40 µM, MK801 at 1 µM and CNQX at 100 µM.

Semi-quantificative analysis of Western blots

Autoradiographs were scanned (Duoscan f40, AGFA) at 800 dpi. Total grey values were obtained using Metamorph software (Meta Imaging Series Version 7.5.6.0, MDS Analytical Technologies). For each experiment, triplicates were made from at least three different cultures. Histograms represent the means of ratios between each grey value of one exosomal pellet to the corresponding lysate.

Electron microscopy

The exosome pellets were immediately fixed by 2% paraformaldehyde, applied to formvar-carbon-coated EM grids and stained with 5% uranyl acetate for 1 min. For immunogold labelling, grids were incubated with primary antibodies as indicated, which were then revealed using protein A gold. The exosomes were then stained with uranyl acetate as described previously.

For morphological analysis, cultures of cortical or hippocampal neurons were stimulated for 1 min with 2 µM ionomycin. Neurons were then fixed immediately in 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer 0.1 M pH 7.2, for at least 2 h. Neurons were post-fixed by 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer 0.1 M for 1 h, stained overnight in 0.5% uranyl acetate, washed and dehydrated in a graded series of ethanol

before inclusion in the Epoxy resine (Fluka, Sigma). Ultrathin sections of 70 nm were cut with an ultramicrotome (Leica, Ultracut S) and stained with uranyl acetate 5% and lead citrate.

For immunogold labelling, cells were incubated overnight with GFP-TTC, washed three times in K5 medium, incubated with 2 μ M ionomycin for 1 min and fixed with 2% paraformaldehyde. Cells were then incubated with anti-GFP antibodies and protein A coupled to gold particles before inclusion as described previously.

For cryomicroscopy, GFP-TTC was incorporated as described previously and the cells fixed with 2% paraformaldehyde, 0.2% glutaraldehyde in cacodylate buffer 0.1 M. Cells were scratched off the substrate and centrifuged at 1200 rpm for 5 min. Pellets were then embedded in gelatine, cryo-protected in 2.3 M sucrose and frozen in liquid nitrogen. Sections of 70 nm were cut using a cryo-ultramicrotome (Reichert Ultracut S, Leica) and immunolabelling was performed according to Tokuyasu (1986). Observations were made using a transmission electron microscope (JEOL JEM 1200 EX) at 80 kV, equipped with a digital camera (Veleta, SIS).

Acknowledgments

This work was supported in part by INSERM, the Université Joseph Fourier, and grants from the Association Française contre les Myopathies, the Association pour la Recherche contre le Cancer and the Association France Alzheimer. G.L. was supported by a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale. A. B. was supported by the Association France Alzheimer.

We thank K. Sadoul and A. Depaulis for the critical reading of the manuscript, C. Chatellard-Causse and T. Grömer for numerous suggestions throughout this work.

References

- Aguzzi, A., Rajendran, L., 2009. The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids. *Neuron* 64, 783–790.
- Arantes, R.M., Andrews, N.W., 2006. A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 26, 4630–4637.
- Belting, M., Wittrup, A., 2008. Nanotubes, exosomes, and nucleic acid-binding peptides provide novel mechanisms of intercellular communication in eukaryotic cells: implications in health and disease. *J. Cell Biol.* 183, 1187–1191.
- Bianco, F., Pravettoni, E., Colombo, A., Schenk, U., Moller, T., Matteoli, M., Verderio, C., 2005. Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 β release from microglia. *J. Immunol.* 174, 7268–7277.
- Bianco, F., Perrotta, C., Novellino, L., Francolini, M., Riganti, L., Menna, E., Saglietti, L., Schuchman, E.H., Furlan, R., Clementi, E., Matteoli, M., Verderio, C., 2009. Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *EMBO J.* 28, 1043–1054.
- Bordet, T., Castelnau-Ptakine, L., Fauchereau, F., Friocourt, G., Kahn, A., Haase, G., 2001. Neuronal targeting of cardiotrophin-1 by coupling with tetanus toxin C fragment. *Mol. Cell. Neurosci.* 17, 842–854.
- Borgonovo, B., Cocucci, E., Racchetti, G., Podini, P., Bachi, A., Meldolesi, J., 2002. Regulated exocytosis: a novel, widely expressed system. *Nat. Cell Biol.* 4, 955–962.
- Chatellard-Causse, C., Blot, B., Cristina, N., Torch, S., Missotten, M., Sadoul, R., 2002. Alix (ALG-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization. *J. Biol. Chem.* 277, 29108–29115.
- Chiappalone, M., Bove, M., Vato, A., Tedesco, M., Martinoia, S., 2006. Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during *in vitro* development. *Brain Res.* 1093, 41–53.
- Cooney, J.R., Hurlburt, J.L., Selig, D.K., Harris, K.M., Fiala, J.C., 2002. Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. *J. Neurosci.* 22, 2215–2224.
- Cordero-Erausquin, M., Allard, S., Dolique, T., Bachand, K., Ribeiro-da-Silva, A., De Koninck, Y., 2009. Dorsal horn neurons presynaptic to lamina I spinoparabrachial neurons revealed by transsynaptic labeling. *J. Comp. Neurol.* 517, 601–615.
- Deinhardt, K., Berninghausen, O., Willison, H.J., Hopkins, C.R., Schiavo, G., 2006. Tetanus toxin is internalized by a sequential clathrin-dependent mechanism initiated within lipid microdomains and independent of epsin1. *J. Cell Biol.* 174, 459–471.
- Fader, C.M., Sanchez, D., Furlan, M., Colombo, M.L., 2008. Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells. *Traffic* 9, 230–250.
- Faure, J., Lachenal, G., Court, M., Hirrlinger, J., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Grange, J., Schoehn, G., Goldberg, Y., Boyer, V., Kirchhoff, F., Raposo, G., Garin, J., Sadoul, R., 2006. Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 642–648.
- Fevrier, B., Vilette, D., Laude, H., Raposo, G., 2005. Exosomes: a bubble ride for prions? *Traffic* 6, 10–17.
- Francis, J.W., Bastia, E., Matthews, C.C., Parks, D.A., Schwarzschild, M.A., Brown Jr., R.H., Fishman, P.S., 2004. Tetanus toxin fragment C as a vector to enhance delivery of proteins to the CNS. *Brain Res.* 1011, 7–13.
- Futter, C.E., Pearce, A., Hewlett, L.J., Hopkins, C.R., 1996. Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J. Cell Biol.* 132, 1011–1023.
- Gerber, S.H., Sudhof, T.C., 2002. Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes* 51 (Suppl 1), S3–S11.
- Ghidoni, R., Paterlini, A., Albertini, V., Glionna, M., Monti, E., Schiaffonati, L., Benussi, L., Levy, E., Binetti, G., 2009. Cystatin C is released in association with exosomes: a new tool of neuronal communication which is unbalanced in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*.
- Herreros, J., Ng, T., Schiavo, G., 2001. Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol. Biol. Cell* 12, 2947–2960.
- Kennedy, M.J., Ehlers, M.D., 2006. Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 325–362.
- Korkut, C., Ataman, B., Ramachandran, P., Ashley, J., Barria, R., Gherbesi, N., Budnik, V., 2009. Trans-synaptic transmission of vesicular Wnt signals through Evi/Wntless. *Cell* 139, 393–404.
- Krämer-Albers, E.M., Bretz, N., Tenzer, S., Winterstein, C., Möbius, W., Berger, H., Nave, K.A., Schild, H., Trotter, J., 2007. Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: trophic support for axons? *Proteomics Clin. Appl.* 1, 1446–1461.
- Maness, P.F., Schachner, M., 2007. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat. Neurosci.* 10, 19–26.
- Marzesco, A.M., Janich, P., Wilsch-Brauninger, M., Dubreuil, V., Langenfeld, K., Corbeil, D., Huttner, W.B., 2005. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J. Cell Sci.* 118, 2849–2858.
- Maskos, U., Kissa, K., St Clément, C., Brulet, P., 2002. Retrograde trans-synaptic transfer of green fluorescent protein allows the genetic mapping of neuronal circuits in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10120–10125.
- Mathivanan, S., Simpson, R.J., 2009. ExoCarta: a compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics* 9, 4997–5000.
- Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Sullivan, M.L., Stolz, D.B., Papworth, G.D., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Wang, Z., Watkins, S.C., Falo Jr., L.D., Thomson, A.W., 2004. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104, 3257–3266.
- Newpher, T.M., Ehlers, M.D., 2008. Glutamate receptor dynamics in dendritic microdomains. *Neuron* 58, 472–497.
- Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., Goud, B., Benaroch, P., Hacohen, N., Fukuda, M., Desnos, C., Seabra, M.C., Darchen, F., Amigorena, S., Moita, L.F., Thery, C., 2010. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* 12, 19–30 sup pp 11–13.
- Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., Johnstone, R.M., 1985. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell Biol.* 101, 942–948.
- Popov, V.I., Medvedev, N.I., Kraev, I.V., Gabbott, P.L., Davies, H.A., Lynch, M., Cowley, T.R., Berezin, V., Bock, E., Stewart, M.G., 2008. A cell adhesion molecule mimetic, FGL peptide, induces alterations in synapse and dendritic spine structure in the dentate gyrus of aged rats: a three-dimensional ultrastructural study. *Eur. J. Neurosci.* 27, 301–314.
- Potolicchio, I., Carven, G.J., Xu, X., Stipp, C., Riese, R.J., Stern, L.J., Santambrogio, L., 2005. Proteomic analysis of microglia-derived exosomes: metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism. *J. Immunol.* 175, 2237–2243.
- Putz, U., Howitt, J., Lackovic, J., Foot, N., Kumar, S., Silke, J., Tan, S.S., 2008. Nedd4 family-interacting protein 1 (Ndfip1) is required for the exosomal secretion of Nedd4 family proteins. *J. Biol. Chem.* 283, 32621–32627.
- Qu, Y., Franchi, L., Nunez, G., Dubyak, G.R., 2007. Nonclassical IL-1 β secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J. Immunol.* 179, 1913–1925.
- Qu, Y., Ramachandra, L., Mohr, S., Franchi, L., Harding, C.V., Nunez, G., Dubyak, G.R., 2009. P2X7 receptor-stimulated secretion of MHC class II-containing exosomes requires the ASC/NLRP3 inflammasome but is independent of caspase-1. *J. Immunol.* 182, 5052–5062.
- Rind, H.B., Butowt, R., von Bartheld, C.S., 2005. Synaptic targeting of retrogradely transported trophic factors in motoneurons: comparison of glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor, and cardiotrophin-1 with tetanus toxin. *J. Neurosci.* 25, 539–549.
- Savina, A., Fader, C.M., Damiani, M.T., Colombo, M.L., 2005. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic* 6, 131–143.
- Simons, M., Raposo, G., 2009. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 11.
- Skog, J., Wurdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Estevés, M., Curry Jr., W.T., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., Breakefield, X.O., 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* 10, 1470–1476.
- Smalheiser, N.R., 2007. Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system. *Biol. Direct* 2, 35.
- Taylor, A.R., Robinson, M.B., Gifondorwa, D.J., Tytell, M., Milligan, C.E., 2007. Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases. *Dev. Neurobiol.* 67, 1815–1829.

- Thery, C., Duban, L., Segura, E., Veron, P., Lantz, O., Amigorena, S., 2002. Indirect activation of naive CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Immunol.* 3, 1156–1162.
- Thery, C., Ostrowski, M., Segura, E., 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 581–593.
- Tokuyasu, K.T., 1986. Application of cryoultramicrotomy to immunocytochemistry. *J. Microsc.* 143, 139–149.
- Turrigiano, G.G., 2008. The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell* 135, 422–435.
- Utvik, J.K., Haglerod, C., Mylonakou, M.N., Holen, T., Kropf, M., Hirling, H., Skare, O., Laake, P., Ottersen, O.P., Haug, F.M., Davanger, S., 2009. Neuronal enriched endosomal protein of 21 kDa colocalizes with glutamate receptor subunit GLUR2/3 at the postsynaptic membrane. *Neuroscience* 158, 96–104.
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., Lotvall, J.O., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659.
- Vella, L.J., Greenwood, D.L., Cappai, R., Scheerlinck, J.P., Hill, A.F., 2008a. Enrichment of prion protein in exosomes derived from ovine cerebral spinal fluid. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 124, 385–393.
- Vella, L.J., Sharples, R.A., Nisbet, R.M., Cappai, R., Hill, A.F., 2008b. The role of exosomes in the processing of proteins associated with neurodegenerative diseases. *Eur. Biophys. J.* 37, 323–332.
- Vingtdeux, V., Hamdane, M., Loyens, A., Gele, P., Drobeck, H., Begard, S., Galas, M.C., Delacourte, A., Beauvillain, J.C., Buee, L., Sergeant, N., 2007. Alkalizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies. *J. Biol. Chem.* 282, 18197–18205.
- Yap, C.C., Wisco, D., Kujala, P., Lasiecka, Z.M., Cannon, J.T., Chang, M.C., Hirling, H., Klumperman, J., Winckler, B., 2008. The somatodendritic endosomal regulator NEEP21 facilitates axonal targeting of L1/NgCAM. *J. Cell Biol.* 180, 827–842.
- Zhang, H.G., Liu, C., Su, K., Yu, S., Zhang, L., Zhang, S., Wang, J., Cao, X., Grizzle, W., Kimberly, R.P., 2006. A membrane form of TNF-alpha presented by exosomes delays T cell activation-induced cell death. *J. Immunol.* 176, 7385–7393.



Emerging role of neuronal exosomes in the central nervous system

Mathilde Chivet^{1,2}, Fiona Hemming^{1,2}, Karin Pernet-Gallay^{2,3}, Sandrine Fraboulet^{1,2} and Rémy Sadoul^{1,2*}

¹ U836, Equipe 2, Neurodégénérescence et Plasticité, INSERM, Grenoble, France

² Grenoble Institut des Neurosciences, Université Joseph Fourier, Grenoble, France

³ U836, Plateforme de microscopie, INSERM, Grenoble, France

Edited by:

Claudia Verderio, CNR Institute of Neuroscience, Italy

Reviewed by:

Eva-Maria Krämer-Albers, Johannes Gutenberg University Mainz, Germany

Frank Kirchhoff, University of Saarland, Germany

*Correspondence:

Rémy Sadoul, Grenoble Institute of Neuroscience, Chemin Fortuné Ferrini, BP 170, F-38042 Grenoble, France.
e-mail: remy.sadoul@ujf-grenoble.fr

Exosomes are small extracellular vesicles, which stem from endosomes fusing with the plasma membrane, and can be recaptured by receiving cells. They contain lipids, proteins, and RNAs able to modify the physiology of receiving cells. Functioning of the brain relies on intercellular communication between neural cells. These communications can modulate the strength of responses at sparse groups of specific synapses, to modulate circuits underlying associations and memory. Expression of new genes must then follow to stabilize the long-term modifications of the synaptic response. Local changes of the physiology of synapses from one neuron driven by another, have so far been explained by classical signal transduction to modulate transcription, translation, and posttranslational modifications. *In vitro* evidence now demonstrates that exosomes are released by neurons in a way depending on synaptic activity; these exosomes can be retaken by other neurons suggesting a novel way for inter-neuronal communication. The efficacy of inter-neuronal transfer of biochemical information allowed by exosomes would be far superior to that of direct cell-to-cell contacts or secreted soluble factors. Indeed, lipids, proteins, and RNAs contained in exosomes secreted by emitting neurons could directly modify signal transduction and protein expression in receiving cells. Exosomes could thus represent an ideal mechanism for inter-neuronal transfer of information allowing anterograde and retrograde signaling across synapses necessary for plasticity. They might also allow spreading across the nervous system of pathological proteins like PrPsc, APP fragments, phosphorylated Tau, or Alpha-synuclein.

Keywords: microvesicles, exosomes, inter-neuronal communication, synaptic plasticity, neurodegeneration, CNS neurons

INTRODUCTION

The development and function of mammals, like that of any multicellular organism, depends on intercellular communication. Classically, this occurs either through direct cell-to-cell interaction bringing together cell surface proteins or, at a distance, through secreted soluble molecules binding to cell surface receptors. These interactions lead to transduction of intracellular signals from the cell surface to the nucleus, where regulation of gene expression might occur. A breach of this dogma, which is based on the impermeable property of biological membranes, came from the demonstration that lipid vesicles containing RNAs and proteins released by mammalian cells, can modify the biological activity of non-contacting cells (Simons and Raposo, 2009). Microvesicles can be shed directly by budding from the plasma membrane. They can also form through budding into the lumen of endosomes and be released after fusion of the limiting membrane of endosomes to the plasma membrane. Once secreted in extracellular milieu the endosomal intraluminal vesicles (ILVs) are referred to as exosomes. Our review will stick to this strict definition of exosomes to discuss the most recent findings indicating the potential role of neuronal exosomes in intercellular communication within the normal and pathological central nervous system.

WHY NEURONS COULD MAKE GOOD USE OF EXOSOMES

It is now widely accepted that exosomes represent a way of intercellular exchange of effector molecules, which allows emitting cells to modify gene and protein expression in receiving cells. They allow transfer of membrane and cytoplasmic proteins (Théry et al., 2002; Morelli et al., 2004), as well as lipids involved in signal transduction (Laulagnier et al., 2004; Subra et al., 2010) or RNAs. Exosomal mRNAs can be translated (Valadi et al., 2007), and small RNAs, including microRNAs (miRNAs) mediate gene silencing in receiving cells (Kosaka et al., 2010; Pegtel et al., 2010; Montecalvo et al., 2012).

Functioning of the brain relies on the capacity of neurons to locally modulate each other at the level of synapses. Chemical synapses are made of a presynaptic part filled with neurotransmitter (NT) – containing vesicles and a post-synaptic part in which NT receptors are anchored at the level of the post-synaptic density (PSD). Specific patterns of stimulation of the presynaptic cell can durably increase or decrease the strength of synaptic responses, thereby reinforcing circuits underlying associations and memory. Changes in synaptic efficacy are based on modifications of the number of post-synaptic NT-receptors or of the amount of NT released pre-synaptically for a given stimulus. Changes of one

neuron driven by another, have so far been explained by ways of classical signal transduction: NTs, lipids, or proteins secreted from one side of the synapse bind to receptors of the opposite surface. Pre-synaptic-activity substances can also be released by cell bodies and dendrites (Regehr et al., 2009). This leads to modulations of second messengers and enzymatic activities acting on effectors of the synaptic changes (adhesion molecules, neurotransmitter receptors, cytoskeleton anchors. . .; Malenka and Bear, 2004). Signal transduction also leads to changes in gene expression and translation, which are needed for long-lasting synaptic modifications (Bullmore and Sporns, 2009). The efficacy of such mechanisms must deal with the extreme compartmentalization of the parenchyma. Indeed, control of transcription occurs in the nucleus far away from synapses undergoing plastic changes. Transcripts can be specifically transported along dendrites to synapses undergoing specific patterns of activation, where they are translated into proteins modifying synaptic strength. Translation of targets mediating dendritic growth can also be regulated by miRNAs, which are expressed within dendrites (Schratt et al., 2006; Siegel et al., 2009). We have recently observed that exosomes secreted by neurons contain miRNAs (unpublished observations). Given that single miRNAs have multiple targets, the impact of exosome-mediated local transfer of miRNA on the pattern of translated mRNAs in receiving neurons may be quite extensive. Confined exchange of RNAs at synapses would thus certainly represent an efficient mechanism for long-term modifications of specific synapses. Therefore, the exosomal pathway may constitute a well designed mechanism for local and systemic inter-neuronal transfer of information within functional brain networks, with a complexity superior to that of direct cell-to-cell contacts or secreted soluble

factors (Belting and Wittrup, 2008). The dark side would be that exosome transfer might also represent a privileged way for propagating pathological alterations throughout the brain (Fevrier et al., 2005; Aguzzi and Rajendran, 2009).

ENDOSOMES IN NEURONS CONTROL SYNAPTIC PLASTICITY

Endosomes are intracellular compartments collecting plasma membrane proteins, which are constantly renewed by constitutive or selective endocytosis (Figure 1). The first compartments to accept incoming proteins after their endocytosis are early endosomes. From there, the majority of the proteins are recycled back to the membrane. Other proteins, classically those meant for degradation, are selectively entrapped in vesicles budding from the endosomal membrane into the lumen of endosomes. Maturation of endosomes leads to individualization of multivesicular bodies (MVBs), which are large vacuoles delimited by a single membrane and containing a varying number of 50–80 nm membrane vesicles (Figure 2; Gruenberg and Stenmark, 2004; van der Goot and Gruenberg, 2006). Invagination of the endosomal membrane leading to the formation of MVBs also allows selective microautophagy of cytoplasmic proteins (Sahu et al., 2011). Membrane and cytoplasmic proteins entrapped in vesicles will be hydrolyzed after fusion of MVBs with lysosomes. They can also be expelled from cells after fusion of MVBs with the plasma membrane leading to the release of exosomes into the extracellular milieu (Figure 1; Simons and Raposo, 2009).

In neurons, endosomes are present in both pre- and post-synaptic compartments. Electron microscopy (EM) observations of the adult hippocampus revealed the presence of MVBs and sorting endosomes in dendritic shafts and inside a limited number

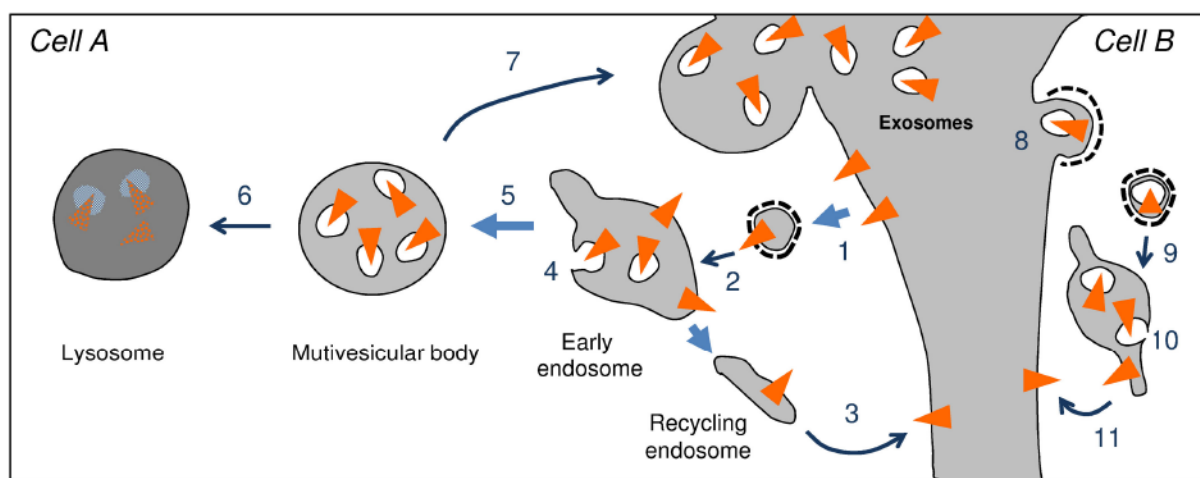


FIGURE 1 | Endosomal trafficking of transmembrane proteins

(triangle). After endocytosis (1) the endocytic vesicle fuses to early endosomes (2). Proteins can be concentrated into recycling endosomes, which fuse to the plasma membrane and allow re-expression at the cell surface (3). Alternatively proteins can be entrapped in vesicles budding from the limiting membrane of the endosome (4). Maturation of the endosome leads to the individualization of a multivesicular body containing intraluminal vesicles (ILV) (5). The multivesicular body can fuse with lysosomes in which the ILVs and their cargoes are hydrolyzed (6). The multivesicular body can also fuse with the plasma membrane (7) thereby

releasing ILVs. Once in the extracellular milieu ILVs are referred to as exosomes. Exosomes released by cell A, can bind to and be endocytosed by a receiving cell [cell B, 8]. The endocytic vesicle containing the exosome fuses with the early endosomes (9). Once inside the endosome, the exosome undergoes back-fusion with the endosomal membrane (10). Fusion of recycling endosomes to the plasma membrane allows expression of protein of the cell A at the surface of cell B. Back-fusion also allows the release of the intraluminal content of exosomes [proteins and RNAs of cell A] into the cytosol of cell B. It is important to note that steps 9, 10, and 11 remain speculative.

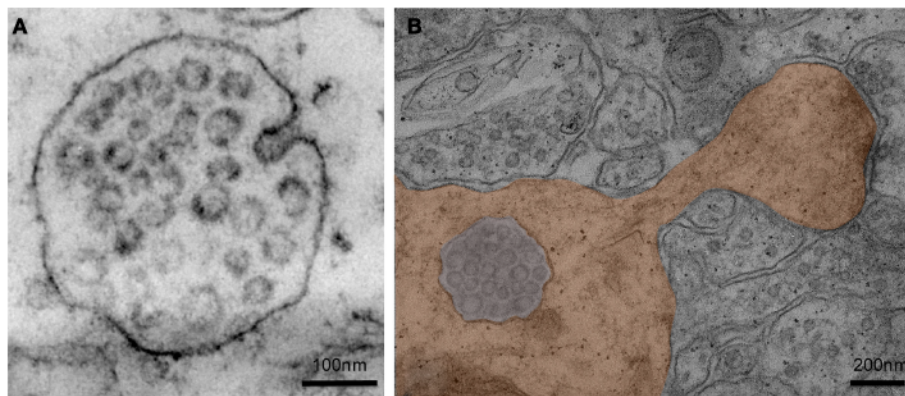


FIGURE 2 | (A) Electron micrograph of a multivesicular body present in a neuron of the CA1 region of the adult rat hippocampus. Note the budding of a vesicle from the limiting membrane of the MVB (upper right; Fiona Hemming, unpublished). **(B)** Electron micrograph of a multivesicular body in a dendrite (colored; CA1 region of an adult rat hippocampus). The protrusion of the

dendrite, called dendritic spine, corresponds to the post-synaptic part of a glutamatergic synapse. Two post-synaptic densities, which anchor ionotropic glutamate receptors, are visible. In this case the multivesicular body is present within the dendritic shaft at the base of the spine neck (Fiona Hemming, unpublished).

of spines, which represent post-synaptic parts of glutamatergic synapses (Figure 2B; Cooney et al., 2002). Noteworthy, is that MVBs are about 50 times more represented in somatodendritic compartments than in axons (Von Bartheld and Altick, 2011). Endosome-containing spines are mostly mushroom-like spines i.e., with the most active synapses (Kasai et al., 2003). Enhancement of synaptic activity after injection of peptides known to improve cognitive functions or during kindling, significantly increased the proportion of MVBs inside spines in the dentate gyrus (Popov et al., 2008; Kraev et al., 2009). Similarly, water maze training of rats led to the migration of MVBs to the vicinity of PSDs in dendrites of CA3 pyramidal cells, while chronic restraint stress diminished the number of MVBs associated with PSDs (Stewart et al., 2005). Similarly neurotrophic factors (BDNF, GDNF) induced a relocalization of dendritic MVBs very near PSDs of hypoglossal motoneurons (Rind et al., 2005). Thus, in the CNS, movements of MVBs to synapses are tightly linked to synaptic plasticity (Von Bartheld and Altick, 2011).

Studies of the trafficking of synaptic AMPA type-receptors, which represent the major mediators of fast synaptic transmission among glutamate receptors of the CNS, led to the demonstration that dendritic endosomes act as stores and sorting platforms for synaptic receptors (Kennedy and Ehlers, 2006). During long-term potentiation (LTP), a form of synaptic plasticity now widely accepted as a model of learning and memory processes (Ehlers, 2000), membrane insertion of new post-synaptic AMPA receptors increases excitatory post-synaptic currents thereby potentiating the synapses. Live cell imaging of dissociated hippocampal neurons demonstrated that glycine stimulation, a protocol used to induce chemical LTP through activation of synaptic NMDA-receptors, leads to the recruitment of endosomes into, or near spines and their fusion with the plasma membrane (Correia et al., 2008; Wang et al., 2008). Thereby, AMPA-Rs present in the limiting membrane of endosomes become inserted at the neuronal surface and diffuse laterally to synaptic sites where they accumulate through interaction with proteins of PSDs. Live imaging of

the insertion at the plasma membrane of transferrin receptors (TfR) contained in endosomes, showed the requirement of Rab11 or syntaxin 13 for the endosomal fusion at the dendritic surface (Park et al., 2006). Accordingly, expression of a dominant negative form of Rab11 was found to inhibit LTP in slice cultures (Brown et al., 2007; Wang et al., 2008), demonstrating that endosomal fusion to the dendritic membrane is a necessary step for synaptic potentiation.

The compartments fusing at the plasma membrane of cultured neurons were identified as recycling endosomes because TfR is usually detected in recycling endosomes, and Rab11 or syntaxin 13 are known regulators of recycling endosomes. However, the strict separation between recycling endosomes and MVBs, considered as late endosomes, needs to be made with caution. Indeed, in reticulocytes, TfR is present in exosomes (Geminard et al., 2004) and Colombo and collaborators found that Rab11 is required for MVB fusion to the plasma membrane in an erythroleukemic cell line (Savina et al., 2005). Furthermore, NEEP21, known to regulate recycling of AMPA receptors at the synapse, has been localized by immunofluorescence inside TfR-containing endosomes of cultured hippocampal neurons (Steiner et al., 2005). However, EM observations of rat brain sections demonstrated that the protein is expressed at PSDs as well as in intraluminal, but not limiting, membranes of MVBs (Utvik et al., 2009). Thus, even if fluorescence data suggest that endosomes fusing to the plasma membrane during synaptic plasticity are recycling endosomes, one cannot yet exclude that some of these endosomes are MVBs. The final proof that MVBs fuse to the dendritic surface awaited the visualization of this process by EM and the demonstration that exosome release is modified by synaptic glutamate receptor activity.

REGULATED SECRETION OF EXOSOMES BY NEURONS

We made the first demonstration that cortical neurons in culture release exosomes (Faure et al., 2006). As in the case of other cells, exosomes isolated from neuron culture media floated on sucrose gradients at a density of 1.1–1.2 g/ml and contained

both Tsg101 and Alix. Tsg101 belongs to the *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT-0 to III), necessary for the making of ILVs accumulating inside MVBs (Babst, 2011). Alix is cytoplasmic protein binding to Tsg101 of ESCRT-I and CHMP4B of ESCRT-III (Missotten et al., 1999; Matsuo et al., 2004). Endophilin A, which also interacts with Alix (Chatellard-Causse et al., 2002), was not detected in exosomes, demonstrating that entry of cargoes into ILVs is regulated. Other cytoplasmic proteins and enzymes were present inside exosomes, including GADPH, ubiquitin, and Hsc70. This is in good agreement with the recent finding that Hsc70 binding to GADPH drives its ESCRT-dependent engulfment into MVB-ILVs (Sahu et al., 2011). Exosomes also contained AMPA-, but not NMDA-receptors and the cell adhesion molecule L1/NgCAM, which, in the central nervous system is expressed only by neurons (Maness and Schachner, 2007), thus demonstrating that exosomes are secreted by neurons. We also observed that electrical activity regulates exosomal secretion since long-term depolarization of neurons with 25 mM potassium strongly increased the release of AMPA-R containing exosomes.

Three other studies reported secretion of exosomes by neurons (Vingtdeux et al., 2007; Putz et al., 2008; Ghidoni et al., 2009). These studies, as well as our initial one, used embryonic neurons cultured for only 3–8 days. In short term cultures, neurons make only few synapses and neurite outgrowth is still on-going. Thus, exosome release could simply reflect the fusion of late endosomes/lysosomes at growth cones necessary for neurite elongation (Arantes and Andrews, 2006).

More recently, we have studied exosome release from fully differentiated cultures (15 DIV; Lachenal et al., 2010). Dissociated cortical cells contain both glutamatergic and GABAergic neurons, which make functional networks within the second week in culture. Thus, incubation with GABA receptor antagonists, such as picrotoxin or bicuculline, alleviates inhibitory activities within the networks and increases synaptic glutamatergic activity. Picrotoxin or bicuculline rapidly (10–15 min) and massively augmented the secretion of exosomes in a way dependent on AMPA- and NMDA-receptors (Lachenal et al., 2010). We also found that increasing cytosolic calcium, using the calcium ionophore ionomycin, drastically elevated exosome secretion. EM examination of cultures treated for 1 min with ionomycin revealed clusters of exosomes at the surface of dendrites visualizing the fusion of MVBs with the plasma membrane. Altogether, our data suggest that calcium entry through synaptic NMDA-receptors is a potent activator of MVB fusion to the plasma membrane and thereby of exosome secretion. The enhanced secretion of AMPA-R-containing exosomes following glutamatergic synaptic activation, underlines exosomal release as a way of local elimination of receptors at synapses undergoing plastic changes. The loss of AMPA receptors upon extensive synaptic activation could be a mechanism of homeostatic synaptic scaling, necessary for adjusting the strength of all of a neuron's excitatory synapses to stabilize firing (Turrigiano, 2008). Thus, while fusion of endosomes leads to an increase of receptors at synapses undergoing potentiation, sustained synaptic activation would lead to calcium increase within the dendritic shaft triggering fusion of MVBs at the base of nearby synapses to allow the local elimination of the intracellular pool of AMPA receptors and

thereby synaptic down-scaling. In this scenario, regulation of the pool of surface synaptic receptors by exosome secretion would be a local event, avoiding retrograde transport of MVBs necessary to hydrolyze the receptors in lysosomes, which are only present in proximal dendrites and soma.

THE FATE OF EXOSOMES RELEASED BY NEURONS

Exosomes were first shown to be endocytosed by dendritic cells of the immune system (Skokos et al., 2003). Those released by neurons into the CNS parenchyma could potentially be endocytosed by nearby cells as shown for oligodendrocyte derived exosomes which are endocytosed by microglial cells (Fitzner et al., 2011). Astrocyte end feet, which enwrap a number of glutamatergic synapses, can also endocytose/phagocytose cellular debris (Haydon and Carmignoto, 2006) and could thus capture exosomes released at synapses. Transfer of exosomes could also occur between spines of the same neuron or across synapses to end up in afferent neurons. Indeed, the diameter of neuronal exosomes is compatible with possible endocytosis in neuronal clathrin coated pits occurring in presynaptic boutons, in spines, or dendritic shafts (Lu et al., 2007). We have recently obtained evidence that exosomes bind to and are endocytosed by hippocampal neurons (unpublished observations) and that they allow the inter-neuronal transfer of Tetanus Toxin, which is known to cross synapses *in vivo* (Lachenal et al., 2010). EM observations are now needed to characterize the site of entry of exosomes and their fate inside endosomes. In non-neuronal cells, the fact that exosomal RNAs can act on receiving cells demonstrates that exosome intraluminal cargoes are released into the cytosol i.e., that the membrane of exosomes fuses with the plasma membrane or with endosomal membranes after their endocytosis (Figure 1). Back-fusion of intraluminal vesicles has been demonstrated to occur in MVBs (Falguieres et al., 2009) and could thus concern exosomes, which have the same origin. Such a process would lead to the entry of exosomal membrane proteins into the endosomal protein pool and possibly re-expression at the cell surface (e.g., AMPA receptors). It would also allow the release into the cytosol of the exosome content, including signal transduction molecules and miRNAs.

RELEVANCE OF NEURONAL EXOSOMES FOR NEURODEGENERATIVE DISEASES

Exosomes can contain pathogenic proteins such as alpha-synuclein, PrPsc, amyloid precursor protein (APP), and phosphorylated Tau, which are involved in Parkinson's, Prion, and Alzheimer's diseases respectively. The scrapie form of the Prion protein (PrPsc) contained in exosomes is secreted via exosomes and remains infectious under this form (Fevrier et al., 2004). Thus, trans-synaptic exchange could be one way for the propagation of Prion diseases from the periphery to the CNS. Alpha-synuclein secreted together with exosomes released by neuroblastoma cells causes cell death of recipient neuronal cells suggesting that alpha-synuclein secretion via exosomes serves to amplify and propagate Parkinson's disease-related pathology (Emmanouilidou et al., 2010). The catabolism of APP giving rise to the amyloidogenic C-terminal APP fragment occurs in endosomes and this fragment as well as A β amyloid peptides, are released by way of exosomes (Rajendran et al., 2006; Vingtdeux et al., 2007; Sharples et al., 2008;

Ghidoni et al., 2011). Exosomes could therefore contribute to the spreading of the pathology throughout interconnected cortical areas. These puzzling hypotheses require *in vivo* work (i) to show that exosomal release from MVBs occurs *in situ* (ii) to find out the privileged site of this release (iii) to demonstrate transsynaptic exchange of exosomes. Furthermore, even though the activity dependent-release of exosomes suggests a genuine function of exosomes in synaptic plasticity, molecular tools to specifically block MVB fusion with the plasma membrane must be developed to test this hypothesis. Nevertheless, studies on exosomes in the CNS are bound to shed new light on intercellular exchanges within the

brain and to open new avenues toward understanding how neurodegenerative diseases spread over time throughout the nervous system.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to K. Sadoul and K. Laulagnier for critical reading of the manuscript and all members of the lab for helpful suggestions. Mathilde Chivet was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. This work was funded by INSERM, Université Joseph Fourier, Fondation France Alzheimer, and ANR (08-Blanc-0271).

REFERENCES

- Aguzzi, A., and Rajendran, L. (2009). The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids. *Neuron* 64, 783–790.
- Arantes, R. M., and Andrews, N. W. (2006). A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 26, 4630–4637.
- Babst, M. (2011). MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 452–457.
- Belting, M., and Wittrup, A. (2008). Nanotubes, exosomes, and nucleic acid-binding peptides provide novel mechanisms of intercellular communication in eukaryotic cells: implications in health and disease. *J. Cell Biol.* 183, 1187–1191.
- Brown, T. C., Correia, S. S., Petrok, C. N., and Esteban, J. A. (2007). Functional compartmentalization of endosomal trafficking for the synaptic delivery of AMPA receptors during long-term potentiation. *J. Neurosci.* 27, 13311–13315.
- Bullmore, E., and Sporns, O. (2009). Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 186–198.
- Chatellard-Causse, C., Blot, B., Cristina, N., Torch, S., Missotten, M., and Sadoul, R. (2002). Alix (ALG-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization. *J. Biol. Chem.* 277, 29108–29115.
- Cooney, J. R., Hurlburt, J. L., Selig, D. K., Harris, K. M., and Fiala, J. C. (2002). Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. *Neurosci. J.* 22, 2215–2224.
- Correia, S. S., Bassani, S., Brown, T. C., Lise, M. F., Backos, D. S., El-Husseini, A., Passafaro, M., and Esteban, J. A. (2008). Motor protein-dependent transport of AMPA receptors into spines during long-term potentiation. *Nat. Neurosci.* 11, 457–466.
- Ehlers, M. D. (2000). Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* 28, 511–525.
- Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S. D., Ntzouni, M., Margaritis, L. H., Stefanis, L., and Vekrellis, K. (2010). Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J. Neurosci.* 30, 6838–6851.
- Falguieres, T., Luyet, P. P., and Gruenberg, J. (2009). Molecular assemblies and membrane domains in multivesicular endosome dynamics. *Exp. Cell Res.* 315, 1567–1573.
- Faure, J., Lachenal, G., Court, M., Hirrlinger, J., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Grange, J., Schoehn, G., Goldberg, Y., Boyer, V., Kirchhoff, F., Raposo, G., Garin, J., and Sadoul, R. (2006). Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 642–648.
- Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H., and Raposo, G. (2004). Cells release prions in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 9683–9688.
- Fevrier, B., Vilette, D., Laude, H., and Raposo, G. (2005). Exosomes: a bubble ride for prions? *Traffic* 6, 10–17.
- Fitzner, D., Schnaars, M., van Rossum, D., Krishnamoorthy, G., Dibaj, P., Bakhti, M., Regen, T., Hanisch, U. K., and Simons, M. (2011). Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J. Cell. Sci.* 124, 447–458.
- Geminard, C., De Gassart, A., Blanc, L., and Vidal, M. (2004). Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TFR for sorting into exosomes. *Traffic* 5, 181–193.
- Ghidoni, R., Paterlini, A., Albertini, V., Glionna, M., Monti, E., Schiaffonati, L., Benussi, L., Levy, E., and Binetti, G. (2009). Cystatin C is released in association with exosomes: a new tool of neuronal communication which is unbalanced in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 32, 1435–1442.
- Ghidoni, R., Paterlini, A., Albertini, V., Glionna, M., Monti, E., Schiaffonati, L., Benussi, L., Levy, E., and Binetti, G. (2011). Cystatin C is released in association with exosomes: a new tool of neuronal communication which is unbalanced in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 32, 1435–1442.
- Gruenberg, J., and Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 317–323.
- Haydon, P. G., and Carmignoto, G. (2006). Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol. Rev.* 86, 1009–1031.
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., and Nakahara, H. (2003). Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci.* 26, 360–368.
- Kennedy, M. J., and Ehlers, M. D. (2006). Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 325–362.
- Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, E., Matsuki, Y., and Ochiya, T. (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J. Biol. Chem.* 285, 17442–17452.
- Kraev, I. V., Godukhin, O. V., Patrushev, I. V., Davies, H. A., Popov, V. I., and Stewart, M. G. (2009). Partial kindling induces neurogenesis, activates astrocytes and alters synaptic morphology in the dentate gyrus of freely moving adult rats. *Neuroscience* 162, 254–267.
- Lachenal, G., Pernet-Gallay, K., Chivet, M., Hemming, F. J., Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Haase, G., Goldberg, Y., and Sadoul, R. (2010). Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol. Cell. Neurosci.* 46, 409–412.
- Laulagnier, K., Grand, D., Dujardin, A., Hamdi, S., Vincent-Schneider, H., Lankar, D., Salles, J. P., Bonnerot, C., Perret, B., and Record, M. (2004). PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes. *FEBS Lett.* 572, 11–14.
- Lu, J., Helton, T. D., Blanpied, T. A., Racz, B., Newpher, T. M., Weinberg, R. J., and Ehlers, M. D. (2007). Postsynaptic positioning of endocytic zones and AMPA receptor cycling by physical coupling of dynamin-3 to Homer. *Neuron* 55, 874–889.
- Malenka, R. C., and Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44, 5–21.
- Maness, P. F., and Schachner, M. (2007). Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat. Neurosci.* 10, 19–26.
- Matsuo, H., Chevallier, J., Mayran, N., Le Blanc, I., Ferguson, C., Faure, J., Blanc, N. S., Matile, S., Dubochet, J., Sadoul, R., Parton, R. G., Vilbois, F., and Gruenberg, J. (2004). Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* 303, 531–534.
- Missotten, M., Nichols, A., Rieger, K., and Sadoul, R. (1999). Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked gene 2 (ALG-2) protein. *Cell Death Differ.* 6, 124–129.

- Montecalvo, A., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Beer Stolz, D., Sullivan, M. L., Karlsson, J. M., Baty, C. J., Gibson, G. A., Erdos, G., Wang, Z., Milosevic, J., Tkacheva, O. A., Divito, S. J., Jordan, R., Lyons-Weiler, J., Watkins, S. C., and Morelli, A. E. (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 119, 756–766.
- Morelli, A. E., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Sullivan, M. L., Stolz, D. B., Papworth, G. D., Zahorchak, A. F., Logar, A. J., Wang, Z., Watkins, S. C., Falo, L. D. Jr., and Thomson, A. W. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104, 3257–3266.
- Park, M., Salgado, J. M., Ostroff, L., Helton, T. D., Robinson, C. G., Harris, K. M., and Ehlers, M. D. (2006). Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron* 52, 817–830.
- Pegtel, D. M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D. A., van Eijndhoven, M. A., Hopmans, E. S., Lindenberg, J. L., de Gruij, T. D., Wurdinger, T., and Middeldorp, J. M. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 6328–6333.
- Popov, V. I., Medvedev, N. I., Kraev, I. V., Gabbott, P. L., Davies, H. A., Lynch, M., Cowley, T. R., Berezin, V., Bock, E., and Stewart, M. G. (2008). A cell adhesion molecule mimetic, FGL peptide, induces alterations in synapse and dendritic spine structure in the dentate gyrus of aged rats: a three-dimensional ultrastructural study. *Eur. J. Neurosci.* 27, 301–314.
- Putz, U., Howitt, J., Lackovic, J., Foot, N., Kumar, S., Silke, J., and Tan, S. S. (2008). Nedd4 family-interacting protein 1 (Ndfip1) is required for the exosomal secretion of Nedd4 family proteins. *J. Biol. Chem.* 283, 32621–32627.
- Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T. R., Keller, P., Geiger, K. D., Verkade, P., and Simons, K. (2006). Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 11172–11177.
- Regehr, W. G., Carey, M. R., and Best, A. R. (2009). Activity-dependent regulation of synapses by retrograde messengers. *Neuron* 63, 154–170.
- Rind, H. B., Butowt, R., and von Bartheld, C. S. (2005). Synaptic targeting of retrogradely transported trophic factors in motoneurons: comparison of glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor, and ciliary neurotrophic factor with tetanus toxin. *J. Neurosci.* 25, 539–549.
- Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C. C., Cannizzo, E. S., Scharf, B., Follenzi, A., Potolicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A. M., and Santambrogio, L. (2011). Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev. Cell* 20, 131–139.
- Savina, A., Fader, C. M., Damiani, M. T., and Colombo, M. I. (2005). Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic* 6, 131–143.
- Schratt, G. M., Tuebing, F., Nigh, E. A., Kane, C. G., Sabatini, M. E., Kiebler, M., and Greenberg, M. E. (2006). A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 439, 283–289.
- Sharples, R. A., Vella, L. J., Nisbet, R. M., Naylor, R., Perez, K., Barnham, K. J., Masters, C. L., and Hill, A. F. (2008). Inhibition of γ -secretase causes increased secretion of amyloid precursor protein C-terminal fragments in association with exosomes. *FASEB J.* 4, 4.
- Siegel, G., Obernosterer, G., Fiore, R., Oehmen, M., Bicker, S., Christensen, M., Khudayberdiev, S., Leuschner, P. F., Busch, C. J., Kane, C., Hubel, K., Dekker, F., Hedberg, C., Rengarajan, B., Drepper, C., Waldmann, H., Kauppinen, S., Greenberg, M. E., Draguhn, A., Rehmsmeier, M., Martinez, J., and Schratt, G. M. (2009). A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the depalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* 11, 705–716.
- Simons, M., and Raposo, G. (2009). Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 11.
- Skokos, D., Botros, H. G., Demeure, C., Morin, J., Peronet, R., Birkenmeier, G., Boudaly, S., and Mecheri, S. (2003). Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. *J. Immunol.* 170, 3037–3045.
- Steiner, P., Alberi, S., Kulangara, K., Yersin, A., Sarria, J. C., Regulier, E., Kasas, S., Dietler, G., Muller, D., Catsicas, S., and Hirling, H. (2005). Interactions between NEEP21, GRIP1 and GluR2 regulate sorting and recycling of the glutamate receptor subunit GluR2. *EMBO J.* 24, 2873–2884.
- Stewart, M. G., Davies, H. A., Sandi, C., Kraev, I. V., Rogachevsky, V. V., Peddie, C. J., Rodriguez, J. J., Cordero, M. I., Donohue, H. S., Gabbott, P. L., and Popov, V. I. (2005). Stress suppresses and learning induces plasticity in CA3 of rat hippocampus: a three-dimensional ultrastructural study of thorny excrescences and their postsynaptic densities. *Neuroscience* 131, 43–54.
- Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., De Medina, P., Monsarrat, B., Perret, B., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., and Record, M. (2010). Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J. Lipid Res.* 51, 2105–2120.
- Thery, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 569–579.
- Turrigiano, G. G. (2008). The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell* 135, 422–435.
- Utvik, J. K., Haglerod, C., Mylonakou, M. N., Holen, T., Kropf, M., Hirling, H., Skare, O., Laake, P., Ottersen, O. P., Haug, F. M., and Davanger, S. (2009). Neuronal enriched endosomal protein of 21 kDa colocalizes with glutamate receptor subunit GLUR2/3 at the postsynaptic membrane. *Neuroscience* 158, 96–104.
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J. J., and Lotvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659.
- van der Goot, F. G., and Gruenberg, J. (2006). Intra-endosomal membrane traffic. *Trends Cell Biol.* 16, 514–521.
- Vingtdeux, V., Hamdane, M., Loyens, A., Gele, P., Drobeck, H., Begard, S., Galas, M. C., Delacourte, A., Beauvillain, J. C., Buee, L., and Sergeant, N. (2007). Alkalinizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies. *J. Biol. Chem.* 282, 18197–18205.
- Von Bartheld, C. S., and Altick, A. L. (2011). Multivesicular bodies in neurons: distribution, protein content, and trafficking functions. *Prog. Neurobiol.* 93, 313–340.
- Wang, Z., Edwards, J. G., Riley, N., Provance, D. W. Jr., Karcher, R., Li, X. D., Davison, I. G., Ikebe, M., Mercer, J. A., Kauer, J. A., and Ehlers, M. D. (2008). Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. *Cell* 135, 535–548.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 14 March 2012; paper pending published: 04 April 2012; accepted: 30 April 2012; published online: 28 May 2012.

Citation: Chivet M, Hemming F, Pernet-Gallay K, Fraboulet S and Sadoul R (2012) Emerging role of neuronal exosomes in the central nervous system. *Front. Physiol.* 3:145. doi: 10.3389/fphys.2012.00145

This article was submitted to *Frontiers in Membrane Physiology and Biophysics*, a specialty of *Frontiers in Physiology*.

Copyright © 2012 Chivet, Hemming, Pernet-Gallay, Fraboulet and Sadoul. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited.

Résumé

Les exosomes sont des vésicules d'origine endocytaire sécrétées par les cellules dans leur environnement après fusion des endosomes multivésiculés avec la membrane plasmique. Ils représentent un nouveau moyen de communication cellulaire par le transfert intercellulaire de protéines, de lipides et d'ARN. Dans le laboratoire, nous nous intéressons aux rôles que pourraient jouer les exosomes neuronaux dans le système nerveux central. Nous avons montré que les neurones matures sécrètent des exosomes. Nous avons mis en évidence que cette sécrétion est directement reliée à l'activité synaptique glutamatergique et à une entrée de Ca^{2+} . Nous avons également découvert que la partie C-terminale de la chaîne lourde de la toxine du tétanos peut être sécrétée par voie exosomale. Nous avons observé que les exosomes la contenant sont repris par des neurones en culture. Un tel cargo semble d'ailleurs influencer le devenir des exosomes. De plus, pour étudier la recapture des exosomes, nous avons utilisé des exosomes de cellules N2a exprimant la tétraspanine CD63 fusionnée à la GFP. En incubant des neurones d'hippocampe avec des exosomes GFP-CD63, nous sommes parvenus à démontrer qu'ils étaient endocytés par les neurones receveurs. Cependant, bien que les exosomes semblent avoir été internalisés, nos résultats suggèrent que leur trafic serait indépendant de la voie endocytaire classique. Enfin, nous nous sommes intéressé au contenu en ARN des exosomes de N2a et de neurones. Nous avons démontré qu'ils contenaient majoritairement des ARN courts (≤ 200 nucléotides) parmi lesquels, les microARN 132 et 138. Les microARN sont de puissants régulateurs de l'expression génique. Leur transfert, via les exosomes, représenterait une nouvelle voie de régulation très fine et avec un impact conséquent sur le fonctionnement du système nerveux. Les exosomes neuronaux pourraient donc jouer un rôle dans la physiologie normale de la synapse, en permettant l'échange d'ARN et de récepteurs aux neurotransmetteurs entre neurones. Ils pourraient également être impliqués dans la propagation de protéines pathogènes comme la toxine du tétanos et la propagation de certaines maladies neurodégénératives comme Alzheimer et Creutzfeldt-Jacob. L'ensemble de nos résultats suggère que les exosomes joueraient un rôle-clé dans le système nerveux central, de par leur implication dans des processus physiologiques et pathologiques.

Mots-clés : exosomes ; neurones ; corps multivésiculés ; toxine du tétanos ; ARN ; système nerveux central

Abstract

Exosomes are vesicles of endocytic origin released by cells into their environment on fusion of multivesicular endosomes with the plasma membrane. They represent a novel mechanism of cell communication by intercellular transfer of proteins, lipids and RNAs. In our laboratory, we are interested in the roles neuronal exosomes could play in the central nervous system. We first showed that mature neurons secrete exosomes and that this is regulated by synaptic glutamatergic activity and by Ca^{2+} influx. We next demonstrated that the C-terminal part of the tetanus toxin heavy chain can be released in association with neuronal exosomes which can then be taken up by other neurons. Moreover, such a cargo seems to influence the actual fate of the exosome. In order to further examine exosome reuptake, we used exosomes from N2a cells expressing the tetraspanin CD63 fused to the green fluorescent protein, GFP. By incubating cultured hippocampal neurons with GFP-CD63 exosomes, we succeeded in proving that they were found inside the recipient neurons. However, although exosomes are internalized, our results suggest that their traffic is independent of the classical endosomal pathway. We also studied the RNAs contained in the N2a and neuronal exosomes. These were mainly short RNAs (≤ 200 nucleotides) including microRNAs 132 and 138. MicroRNAs are key regulators of gene expression. Their transfer by exosomes could represent a new way for fine regulation with a potentially powerful impact on the nervous system. Neuronal exosomes could play a crucial role in the normal physiology of synapses, by allowing the exchange of RNAs and neurotransmitter receptors between neurons. They could also propagate pathogenic proteins such as tetanus toxin and be involved in neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Creutzfeldt-Jacob's diseases. Altogether, our results pave the way towards the demonstration that exosomes play an important part in the functioning of the central nervous system via their involvement in physiological and pathological processes.

Key words: exosomes; neurons; multivesicular bodies; tetanus toxin; RNA; central nervous system